

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
FACULTAD DE MEDICINA.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

ANALISIS INMUNIHISTOQUIMICO
DEL DESARROLLO EVOLUTIVO DEL
TRACTO GENITAL FEMENINO Y SU
APLICACION EN EL ESTUDIO DE
TUMORES EPITELIALES OVARICOS

Memoria presentada por
Maria Castro Sánchez
para optar al Grado de Doctor.

DIRECTOR

Prof. Dr. ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA.

CATEDRATICO DE ANATOMIA.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

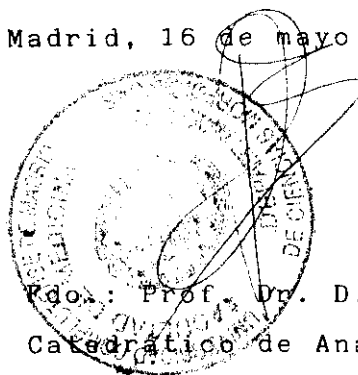
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

MADRID

DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO DE ANATOMIA
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

I N F O R M A: Que el trabajo titulado: " ANALISIS INMUNOHIS-
TOQUIMICO DEL DESARROLLO EVOLUTIVO DEL TRACTO
GENITAL FEMENINO Y SU APLICACION AL ESTUDIO -
DE TUMORES EPITELIALES OVARICOS", ha sido rea-
lizado por D^a Maria Castro Sanchez, bajo mi -
dirección durante los años 1984-1990, en los
laboratorios de Embriología del Departamento
de Ciencias Morfológicas, reuniendo todos los
requisitos para ser presentado y defendido co-
mo Tesis Doctoral.

Madrid, 16 de mayo de 1991.



Pdo.: Prof. Dr. D. J. Puerta.
Catedrático de Anatomía.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

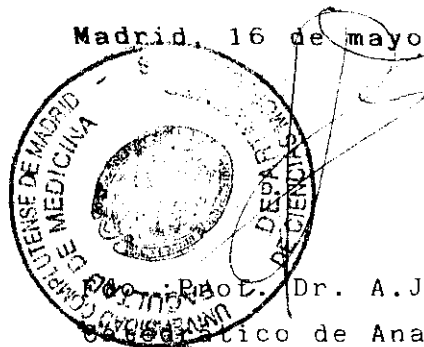
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

MADRID

DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO-DIRECTOR
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS DE LA FACULTAD -
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

I N F O R M A: Que el trabajo titulado: " ANALISIS INMUNO-
HISTOQUIMICO DEL DESARROLLO EVOLUTIVO DEL
TRACTO GENITAL FEMENINO Y SU APLICACION -
AL ESTUDIO DE TUMORES EPITELIALES OVARI--
COS", presentado por D^a Maria Castro San-
chez, reúne las condiciones para ser pre-
sentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, 16 de mayo de 1991



Dr. A.J. Puerta
Catedrático de Anatomía-Director
Departamento C. Morfológicas.

A mi hija Ana

INDICE

	Pag
AGRADECIMIENTOS	IV
I- INTRODUCCION	1
II- OBJETO DEL ESTUDIO	5
III- JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	8
III.1. Los marcadores tumorales como ayuda al diagnóstico precoz y manejo de tumores .. del tracto genital	10
III.2. Características de un marcador tumoral ..	11
III.3. Tipos de marcadores tumorales	11
III.4. Un nuevo campo: La inmunohistopatología ..	15
III.5. Utilidad de la tipificación antigénica .. de los tejidos	24
IV- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	31
IV.1. Embriología del aparato genital femenino	33
IV.1.1. Introducción	34
IV.1.2. Desarrollo de las gónadas	35
IV.1.3. Diferenciación del ovario	36
IV.1.4. Factores que influyen la dife- renciación gonadal	37
IV.1.5. Diferenciación de los conductos .. genitales femeninos	40
IV.2. Histología funcional ovárica	44
IV.2.1. Anatomía ovárica	46
IV.2.2. Vascularización del ovario	46
IV.2.3. Linfáticos	47
IV.2.4. Inervación	47
IV.2.5. Superficie epitelial ovárica	50
IV.2.6. Estroma	55
IV.2.7. Clasificación de células	60
intersticiales	60
IV.3. Técnicas de inmunohistoquímica. Anticuer- pos monoclonales	64

II

IV.3.1.	Introducción	65
IV.3.2.	Campos de aplicación de técnicas inmunohistoquímicas	68
IV.3.3.	Conceptos básicos de inmunología	71
IV.3.4.	Anticuerpos monoclonales	75
IV.3.5.	Tratamiento de los tejidos para . la utilización de técnicas de ... inmunohistoquímica	78
IV.3.6.	Procedimientos técnicos inmuno- . histoquímicos básicos	88
IV.3.7.	Técnica de la inmunoperoxidasa ..	93
IV.3.8.	Control de calidad de las	
	técnicas IHQ	103
IV.3.9.	Procedimientos dobles	104
IV.4.	Panel de anticuerpos monoclonales utili- zados en el estudio: Características ..	
	de los anticuerpos	107
IV.4.1.	Filamentos intermedios	108
IV.4.2.	Keratinas	111
IV.4.3.	AE1/AE3	118
IV.4.4.	PKK.1	120
IV.4.5.	CAM.5.2.	122
IV.4.6.	Vimentina	129
IV.4.7.	Desmina	139
IV.4.8.	EMA (anti-antígeno humano epite- lial de membrana	142
IV.4.9.	S-100	151
IV.4.10	Factor VIII	155
IV.4.11	Antígeno H del grupo sanguíneo ..	156
IV.4.12	Alfa-1-antitripsina	160
IV.4.13	Alfa feto proteína	161
IV.4.14	Ki-67	165
IV.4.15	URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10	168
V.	MATERIAL Y METODO	173
V.1.	Material	174

III

V.1.1.	Fuente de obtención de los tejidos	176
V.1.2.	Descripción de los casos utilizados.	177
V.2	Método	181
V.2.1.	Relación de los anticuerpos	
	utilizados	182
V.2.2.	Técnicas para inmunotinción con . anticuerpos monoclonales en teji- en parafina	187
V.2.3.	Técnicas para inmunotinción con . anticuerpos monoclonales en teji- en congelación	193
V.2.4.	Dilución de los anticuerpos	197
V.2.5.	Formulación de reactivos	199
V.2.6.	Técnicas de control de las inmu- notinciones	201
VI.	RESULTADOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	202
VI.1.	Vimentina	203
VI.2.	Desmina	212
VI.3.	AE1/AE3	219
VI.4.	PKK.1	223
VI.5.	EMA (anti-antígeno humano epitelial	
	de membrana	234
VI.6.	CAM.5.2.	242
VI.7.	Antígeno H del grupo sanguíneo	253
VI.8.	Factor VIII	255
VI.9.	S-100	257
VI.10.	Alfa feto proteína	261
VI.11.	Alfa-1 antitripsina	264
VI.12.	Ki-67	267
VI.13.	URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10	268
	FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	275
VII.	DISCUSION	314
VIII.	CONCLUSIONES	357
IX.	BIBLIOGRAFIA	364

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me es difícil resumir en unas líneas mi profundo agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este trabajo se viera realizado.

Aunque los estudios realizados para obtener una tesis doctoral, se presentan como el trabajo de una sola persona, nada más lejos de la realidad, en mi caso e imagino en la mayoría de este tipo de trabajos. Este estudio es el fruto del trabajo, generoso y desinteresado, de la dedicación y del interés de todo un grupo de personas.

Sin la colaboración de todos los compañeros, profesores, amigos y la familia incluso, no habría sido posible su realización.

Mi principal agradecimiento es al hecho de haberme permitido descubrir este trabajo la generosidad y la dedicación desinteresada de todas las personas que me han ayudado, a lo largo de los años que han sido necesarios para llevar a cabo este estudio.

Han sido muchas las personas que me han apoyado y ha sido su ayuda y su confianza la que en los muchos momentos de desaliento me hicieron seguir adelante.

Son muchas las dificultades que surgen en la realización de este tipo de trabajo.

Siempre he admirado y respetado la labor del investigador, pero después de estos años de intentar hacer una humilde contribución a la investigación he aprendido a valorar aún más esa labor, y a admirar a todos aquellos que dedican su trabajo a esta mal reconocida tarea.

He de agradecerle también a este trabajo el descubrimiento, obligado por la imperiosa necesidad, del para mí misterioso mundo del ordenador, convertido en un imprescindible arma de trabajo en la actualidad. Han sido varias las personas que me han ayudado a

VI

ello, y de forma muy especial, mi marido que me ha dedicado con paciencia su tiempo.

Tengo la esperanza de que este trabajo no defraude a todas las personas que tanto me han ayudado y alentado, y que han hecho posible que mi ilusión de verlo concluida haya sido una realidad.

Mi reconocimiento, profunda gratitud, y sincero afecto a todos ellos son infinitos.

Al Profesor Puerta Fonolla (Catedrático de Anatomía de la Universidad Complutense de Madrid), que recogió mi ilusión y el deseo de realizar la tesis doctoral. Desde el primer momento me animó para su realización y me ayudó a elegir la línea de trabajo, aconsejándome siempre y atendiéndome con gran paciencia y con consejos valiosos.

Su espíritu de trabajo, su afán investigador y su gran dedicación han sido siempre un gran aliento para mí.

Al Profesor Gallego (Catedrático de Fisiología Humana de la Universidad Complutense de Madrid) y a la Profesora Barón (Decana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares) que en los primeros momentos de iniciar este trabajo me comunicaron su fe en que investigar en éste país era posible, con ilusión y trabajo.

Al Dr. Peña (Profesor Titular del Departamento de Anatomía de la Universidad Complutense de Madrid) que me ayudó en todo momento y cuyo ejemplo en la labor investigadora instaba a seguir trabajando.

Al departamento de Anatomía I de la Universidad Complutense en quien siempre he encontrado la máxima colaboración.

Estoy agradecida a los miembros del servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Guadalajara y a su Jefe de Servicio el Dr. Jaime Sánchez (Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, Departamento de Especialidades Médicas, Área de Anatomía Patológica de la Universidad de Alcalá de Henares) que hizo posible que se realizaran en su departamento las técnicas de inmunohistoquímica.

VII

De forma muy especial le estoy agradecida al Dr. Jesús Cuevas Santos (Patólogo y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, Departamento de Especialidades Médicas, Area de Anatomía Patológica de la Universidad de Alcalá de Henares), por el que siento un profundo reconocimiento a su labor profesional y una sincera amistad.

Sin su insustituible colaboración no me habría sido posible realizar este trabajo.

Le estoy sinceramente agradecida por su ayuda en la revisión de los casos y por todas las enseñanzas que he recibido de él.

Al Dr. M. Morente Gallego (Patólogo y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, Departamento de Especialidades Médicas, Area de Anatomía Patológica de la Universidad de Alcalá de Henares), cuyos conocimientos de inmunohistoquímica y su colaboración me han sido de gran utilidad.

A la Dra. Pilar González Paramétio y al Dr. Segundo Martín Carballido (Patólogos) por su colaboración.

A Doña Asunción Bernal Barriuso (DUE) y a Doña Pilar Embid Embid (Técnico de Anatomía Patológica) mi más sincera gratitud y reconocimiento a su trabajo, siempre meticuloso en la realización de las técnicas y mi agradecimiento por haber dedicado, su ya bien ocupado tiempo en la ardua labor asistencial para hacer posible la realización de las técnicas de inmunohistoquímica de una forma escrupulosa, paciente y desinteresada.

Al Dr. Félix Manzarbeitia (Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Móstoles) por la ayuda que he recibido de él y de todo su equipo para la recogida de las muestras y su procesamiento.

A mis compañeros y amigos, Dr. Silva (Ginecólogo), por la lectura crítica de este trabajo y sus valiosos consejos.

A la Dra. Piernas (Ginecólogo) que a lo largo de las muchas horas compartidas de trabajo en estos años siempre ha sido un apoyo para mí.

VIII

A Doña Teresa Ramírez Alonso por su paciente colaboración en la transcripción de este trabajo.

A mis padres, que siempre me impulsaron en mis estudios y cuya fe en mi trabajo ha sido siempre un motivo importante para continuar. Quiero agradecerles su callada labor y las horas que con gran amor han dedicado al cuidado de mi hija Ana, para poder disponer de tiempo para este trabajo.

A mi hermano, por su ayuda en la búsqueda bibliográfica.

Al resto de mi familia que siempre me han alentado a continuar en los momentos de desaliento.

A mi marido que ha dedicado muchas horas a ayudarme y a escribir este trabajo y cuyo apoyo y fé en mi trabajo han sido siempre incondicionales.

Es difícil encontrar una forma original de resumir mi sentimiento hacia todas estas personas que me han ayudado, pero creo que todo se puede resumir en una sencilla y sincera palabra.

Gracias.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo el estudio de los tejidos, tanto en su expresión normal como neoplásica, se basó fundamentalmente en las observaciones morfológicas, a nivel macro y microscópico.

En base a las observaciones morfológicas, fundamentalmente, se ha estudiado el desarrollo evolutivo de los tejidos normales, y se han clasificado los tumores.

Los estudios morfológicos, de reconocida utilidad, han presentado algunas limitaciones, tanto en los estudios del desarrollo, como para poder determinar con claridad la histiogénesis de algunos tumores. El conseguir métodos para profundizar en estos dos aspectos, supone un avance, al permitir profundizar en el conocimiento de la biología tisular, y en muchos casos ha aportado datos para apoyar teorías basadas en hallazgos morfológicos.

La demostración por COONS y col. en 1942, de antígenos neumocócicos en tejidos, con la ayuda de anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes, supuso un gran avance.

Estas técnicas supusieron un gran paso hacia delante en la caracterización de antígenos tisulares, así como para los diagnósticos patológicos (228).

En años más recientes el empleo de anticuerpos unidos a ferritinas o a enzimas ha permitido la identificación de muchos antígenos a nivel tisular y ultrestructural (233).

Los primeros anticuerpos utilizados eran policlonales, lo que motivaba la detección de antígenos diferentes a los buscados.

El desarrollo reciente de la obtención de anticuerpos monoclonales con técnicas de hibridación por Köler y Milstein en 1972 (147), ha permitido la obtención de anticuerpos frente a un

solo determinante, lo que presenta grandes ventajas respecto al uso de anticuerpos policlonales.

Con la experimentación, se ha comprobado que, muchos de estos anticuerpos, reconocen antígenos en células distintas a las ya esperadas.

Con estas técnicas es posible conocer la caracterización antigénica de los tejidos, y profundizar en su estudio funcional, permitiendo obtener información inalcanzable con otras.

Se ha observado que algunos de los antígenos, que se pueden detectar con anticuerpos monoclonales, se comportan como marcadores tumorales y algunos de ellos como marcadores oncofetales.

Son muchos los investigadores que opinan que el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de inmunohistoquímica, podría contribuir a introducir un profundo cambio, en muchos campos, incluidos, los estudios sobre el desarrollo y el diagnóstico patológico.

En los últimos años se han obtenido anticuerpos monoclonales frente a los filamentos intermedios y diversos antígenos tisulares.

La repercusión de los estudios y hallazgos con los anticuerpos monoclonales en inmunohistoquímica, no han tenido aún toda la repercusión clínica que se puede esperar.

Parece asumido que el amplio abanico de posibilidades que las técnicas de inmunohistoquímica presentan, contribuirán a mejorar, los estudios sobre el desarrollo, el diagnóstico histopatológico, y que podrían llegar a utilizarse de forma más o menos rutinaria en el diagnóstico precoz e incluso en terapéutica.

Sobre esta última posibilidad se han realizado trabajos uniendo quimioterápicos a un determinado anticuerpo tisular para realizar un tratamiento oncológico dirigido.

Para mejorar los resultados y ampliar su utilización en la clínica se precisa, de aumentar los conocimientos sobre la expresión antigénica de los diferentes tejidos.

Hasta ahora los resultados en la tipificación antigénica de los tejidos, con estas técnicas no han sido absolutamente homogéneos, lo que se podría explicar tanto por la diferente sensibilidad de las técnicas utilizadas, como por la no homogeneidad en la expresión, o en la intensidad de la misma, en los diferentes tejidos, sobre todo si se refiere a tejidos neoplásicos.

El objeto de este trabajo es realizar un estudio evolutivo del perfil antigénico del tracto genital femenino. Para ello se estudia el perfil antigénico en el feto, en el adulto y en los tumores epiteliales ováricos, utilizando un panel de dieciséis anticuerpos monoclonales.

Se emplean anticuerpos monoclonales por las ventajas de especificidad que presentan respecto a los anticuerpos policlonales, la técnica empleada es la de la peroxidasa anti-peroxidasa por, por ser una de las de uso más difundido y experimentado en inmunohistoquímica.

Los resultados obtenidos en la identificación de antígenos tisulares pueden verse influenciados por el método empleado para su conservación, congelación o parafina, por lo que pretendemos en este trabajo hacer un estudio comparativo entre ambos.

El poder determinar que se obtienen buenos resultados con un determinado anticuerpo monoclonal empleando tejidos en parafina es importante, ya que esto permitiría realizar más fácilmente estudios retrospectivos y permitiría una buena tipificación de los mismos.

CAPITULO II

OBJETO DEL ESTUDIO

OBJETO DEL ESTUDIO

El principal objetivo del presente trabajo es definir la expresión y/o modulación de los fenotipos antigénicos en las células del aparato genital interno femenino, tanto en fetos como en adulto de acuerdo con el tipo celular.

Estudiaremos fundamentalmente los epitelios ovárico, tubárico y endometrial.

Estudiaremos también la expresión antigénica de los tumores epiteliales ováricos y se realizará un estudio comparativo de la expresión antigénica de dichos tumores epiteliales con la expresión antigénica de los epitelios tubárico, ovárico y endometrial, tanto en feto como en tejido adulto sano, para realizar un estudio inmunológico comparativo entre ellos.

Para ello utilizaremos un panel de anticuerpos monoclonales que detectan antígenos de diferenciación y antígenos estructurales para definir la distribución immunoanatómica de este sistema antigénico.

El panel de anticuerpos utilizados incluye el estudio de los siguientes antígenos, antígenos del tracto urinario (URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10) antígenos del citoesqueleto y de los filamentos intermedios (AE-1/AE-3, PKK.1, CAM.5.2., Vimentina y Desmina) antígenos tisulares asociados (EMA, Factor VIII, S-100 y GS-H) y alfa-1-antitripsina y la AF-proteína.

En estudios anteriores con técnicas de inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia realizados en tejido adulto sano, fetal y tumoral han demostrado la expresión de estos antígenos en diferentes células del aparato genital interno femenino.

Estudios realizados correlacionando la expresión antigénica entre tejido fetal y adulto sano han revelado, en diferentes órganos del organismo, que alguno de estos antígenos pueden aparecer en diferentes estadios de la maduración, representando diferentes eventos, más precoces y más tardíos de la expresión antigénica.

Estos anticuerpos ofrecen un amplio rango de aplicaciones potenciales que incluyen estudios de la embriogénesis del tracto genital femenino y análisis inmunopatológicos de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas del tracto genital femenino.

Alguno de estos antígenos se ha demostrado que se comportan como verdaderos marcadores tumorales, oncofetales, resultados en principio no esperados, y que han sido fruto de la experimentación con los mismos en los diferentes tejidos y en diferentes estadios del desarrollo.

Por todo lo anteriormente expuesto pensamos que el conocimiento de la expresión antigénica del tracto genital femenino, en fetos, poco estudiado y su correlación con tejidos sanos y neoplásicos puede contribuir a un mejor conocimiento biológico de estos tejidos, aportando una contribución al estudio del desarrollo, y al estudio de tejidos neoplásicos y no neoplásicos del tracto genital femenino.

CAPITULO III

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El cáncer de ovario representa aproximadamente el 25% de los cánceres ginecológicos pero es el responsable en la mujer del 45% de las muertes oncológicas. Menos el 35% de las mujeres que padecen la enfermedad sobrevivirán más de 5 años después del diagnóstico.

En un estudio en Inglaterra y en Gales de 1931 a 1970 se revela una disminución de la tasa de mortalidad por cáncer de cérvix, una estabilización de la mortalidad por cáncer de mama, mientras que la mortalidad por cáncer de ovario aumenta.

La mortalidad por cáncer de ovario rebasa el total de muertes generadas por la suma de cáncer cervical y carcinoma endometrial (43).

La alta mortalidad del cáncer de ovario es debida fundamentalmente a la dificultad en el diagnóstico precoz, dicha dificultad estriba en el largo periodo asintomático de estos tumores y en la falta de medios sensibles para su diagnóstico en estadios iniciales.

El avance en el diagnóstico precoz tendrá una gran repercusión clínica dado que en estadios 1 y 2 hay un 61% de supervivencia media a los 5 años (40).

De estos datos se puede concluir que todo estudio para profundizar en el conocimiento del tejido ovárico y de su comportamiento está justificado no sólo por el puro interés en el conocimiento de la biología de los tejidos, sino porque esta profundización, tanto en el conocimiento del tejido sano, como en su diferenciación tumoral puede contribuir a mejorar, aunque posiblemente a largo plazo los diagnósticos precoces y a mejorar el manejo de las tumoraciones del aparato genital interno, lo que tendría una gran repercusión en la clínica y conllevará una mejora en la supervivencia.

III. 1. LOS MARCADORES TUMORALES COMO AYUDA AL DIAGNÓSTICO PRECOZ Y MANEJO DE TUMORES DEL TRACTO GENITAL

Se han hecho muchos intentos para aislar marcadores tumorales que sirvan, tanto para el diagnóstico precoz, como para el seguimiento oncológico.

Hasta la fecha no se ha encontrado ningún marcador específico capaz de discriminar entre distintos tipos de tumores ováricos (22) (159).

Recientes avances en biología celular, especialmente la introducción de técnicas de hibridoma descritas por Köhler y Milstein (147), para obtener anticuerpos monoclonales, han hecho posible la obtención de una forma fácil de anticuerpos monoclonales específicos frente a diferentes antígenos.

Esta nueva técnica abría nuevas perspectivas para el estudio de antígenos tumorales y el estudio inmunopatológico de los tumores. Usando estas técnicas nuevos sistemas antigénicos han sido definidos en diferentes tejidos algunos de ellos útiles para tumores ováricos (51) (25) (141) (23) (16).

Melchert y Kreinberg, 1981 exponen "que sólo pueden definirse de un modo general el concepto de marcador tumoral, en el sentido de que se trata de modificaciones de sustancias o tejidos a desarrollos malignos".

Se han descubierto un alto número de marcadores tumorales supuestamente específicos, que han demostrado una positividad en determinados tejidos oncológicos pero en la mayoría de ellos con posterioridad se ha demostrado en sujetos o tejidos sanos.

III. 2. CARACTERÍSTICAS DE UN MARCADOR TUMORAL

Un marcador tumoral debe cumplir las siguientes condiciones:

1. Diferenciación cualitativa o cuantitativa entre normal, benigno o maligno.
 2. Elevada especificidad.
 3. Elevada sensibilidad.
- Un marcador debe permitir la selección entre un sujeto sano o enfermo y entre un tejido sano o tumoral.
 - Debe permitir la localización del tumor.
 - Debe servir para demostrar modificaciones en el desarrollo del tejido tumoral secundaria a la terapéutica.
 - Debe servir para reconocer determinados tipos de tumores.
 - Debería dar información sobre el grado de diferenciación del tumor.
 - Debería ser útil para el reconocimiento de la recidiva local.
 - Y debe ser útil para la identificación del tumor primario a partir de una metástasis.

En la actualidad ningún marcador tumoral utilizado en oncología ginecológica cumple todos los requisitos descritos.

En los momentos actuales la utilización de técnicas de inmunohistoquímica en el estudio de los tumores permite seleccionar marcadores más útiles para el seguimiento de la enfermedad (43).

III. 3. TIPOS DE MARCADORES TUMORALES

La mayoría de las células tumorales poseen antígenos específicos que no se encuentran en las células sanas y a estos se les denomina antígenos tumorales, fueron demostrados en 1957 por Preh y Main.

Para el estudio de antígenos tumorales se han utilizado tumores inducidos, más inmunogénicos que los tumores espontáneos.

En el estudio de antígenos tumorales se han utilizado tumores inducidos, más inmunógenos que los tumores espontáneos.

En la superficie de estos tumores inducidos aparecen 3 tipos principales de antígenos.

1. Antígenos privados:

Son específicos para el tipo del tumor inducido por el carcinógeno y no presentan reacciones cruzadas con otros tumores en el mismo huésped.

2. Antígenos de reacción cruzada:

Específicos del carcinógeno, semejantes en todos los tumores inducidos por el mismo carcinógeno.

3. Antígenos fetales:

Asociados a tumores inducidos experimentalmente, tumores humanos espontáneos y presentes en tejidos embrionarios y fetales, por lo que estructuralmente no se podrían considerar como antígenos fetales.

Levi, Parshley y Mandl en 1968 identifican un antígeno tumoral específico para cistoadenoma seroso del ovario (213).

Un poco más tarde, Joachim (134) descubrió que el antígeno tenía reactividad cruzada con los otros tipos de carcinomas ováricos.

La determinación de antígenos tumorales en sangre ha despertado gran interés.

Los antígenos tumorales CEA y Alfa fetoproteína, pueden ser identificados en el ovario pero no ayudan al diagnóstico precoz.

Pregnancy specific-B1 glicoproteína, HCG y LP (57) han sido detectados de forma irregular en pacientes con tumores epiteliales ováricos, pero no son específicos para dichos tumores, con lo cual la ayuda que prestan al clínico es limitada.

Algunos antígenos tumorales han alcanzado aplicación clínica en ginecología oncológica como:

* CEA (ANTIGENO CARCINOEMBRIONARIO)

El CEA se utiliza en ginecología oncológica dado que aunque no es específico para tumores ováricos aparece aumentado en los mismos.

También aparece aumentado el CEA en tracto digestivo, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, fumadores, alcohólicos, etc.

Se ha utilizado en el seguimiento del carcinoma ovárico. Khoo 1976 (144) lo introduce para utilizarlo en el control postoperatorio, su desaparición habla a favor de un buen pronóstico o una subida o valores constantemente altos son de mal pronóstico.

Van Nagell y Col. 1975 utilizan la determinación de CEA en el líquido de tumores quísticos para diferenciar entre tumores quísticos mucosos (CEA positivos en un 75%) y adenocarcinoma seroso quístico (CEA negativo en el 100%) .

También se ha encontrado una correlación entre el nivel del CEA con el estadio tumoral en el ovario (Malkin 1978).

Mayers et al 1979 lo han utilizado para valorar el pronóstico, intentando valorar el intervalo libre de enfermedad en el cáncer de mama (encuentran que este intervalo es unos 100 días más corto cuando existe CEA elevado que cuando el CEA es normal).

* ALFA - FETO - PROTEINA

Es una proteína oncofetal identificada mediante electroforesis en sangre de cordón en neonatos por Bergstrand en 1976 y que fué llamada inicialmente componente X.

Aunque su función en el embarazo no es conocida se ha utilizado entre otras cosas como marcador tumoral en tumores ováricos de células germinales.

* OCAA-1 (Ovarian cistoadenocarcinoma associated antigens)

Purificado por Bhattacharya y Barlow (22), se ha comprobado en carcinoma ovárico avanzado. Su nivel sérico está relacionado con la masa tumoral y el estadio clínico de la enfermedad.

* CA-125

Anticuerpo monoclonal murino que reacciona con antígenos encontrados en la superficie de algunos tumores ováricos.

Reconoce algunos pero no todos los tumores serosos, endometrioides y de células claras y es negativo en todos los casos de tumores mucinosos.

Esta diferencia inmunológico sugiere a Kabawat que los tumores mucinosos deben pertenecer a otro subgrupo de tumores ováricos epiteliales.

Su determinación en suero muestra una gran variabilidad día a día (de hasta un 15%).

Bast (17) tomando como valor normal 65 unidades/ml. encuentran que un 70% de los tumores epiteliales presentan CA-125 elevado.

*Ca 19-9

Antígeno tumoral de características parecidas al CA-125 pero menos complejo estructuralmente identificado por Koprowski 1979.

Se ha encontrado elevado en el carcinoma ovárico mucinoso y negativo en el carcinoma ovárico seroso.

III. 4. UN NUEVO CAMPO: LA INMUNOHISTOPATOLOGÍA

La producción de anticuerpos monoclonales según la técnica descrita por Köhler y Milstein (147) ha hecho posible el inicio de una nueva forma de investigación en los tejidos, la inmunohistopatología.

Con la inmunohistopatología se abre un nuevo campo para el conocimiento de los tejidos sanos o tumorales.

El análisis inmunopatológico de los tejidos tumorales contribuirá a una mejor clasificación de los mismos y a una profundización en el conocimiento de la histogénesis tumoral.

El interés de este tipo de estudio se ve reflejado en los trabajos de reciente aparición de diferentes grupos de investigación en tejidos tumorales y tejidos sanos con diferentes tipos de anticuerpos monoclonales, algunos de ellos marcadores tumorales.

Algunos de estos trabajos han llevado a resultados sorprendentes.

Se ha encontrado:

1. Reacciones cruzadas en anticuerpos que en principio fueron descritos como específicos para un determinado tipo de tumor.
2. Diferente comportamiento de un anticuerpo en tumores ováricos de un mismo origen.
3. Reacciones de anticuerpos obtenidos contra antígenos tumorales en tejidos sanos.
4. Reacciones de anticuerpos obtenidos contra antígenos de tumores malignos en tumores benignos (141).

5. No uniformidad en el reconocimiento de distintos tipos de tumores.
6. No uniformidad en la distribución de los antígenos dentro de un mismo tejido.
7. Utilidad para la clasificación de los tumores (51) (23) (141).
8. No diferencia en los patrones, en general entre tejidos tumorales primarios y metastásicos.
9. Ayuda para el diagnóstico pero falta de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico patológico definitivo.
10. Algunos anticuerpos desarrollados como específicos para células tumorales han resultado no serlo pero tener actividad frente estructuras con terminales carbohidrato, como grupos sanguíneos.
11. Posibilidad de valoración pronóstica con anticuerpos monoclonales.
12. Ayuda en el diagnóstico citológico de líquidos ascíticos para la determinación de origen del tumor primario.
13. Diferencias en el comportamiento de anticuerpos monoclonales entre tejidos adultos sanos y tejidos fetales.

III. 4. 1. Reacciones cruzadas de anticuerpos en principio descritos como específicos para un determinado tipo de tumor:

a) Reacción positiva de MFG1 (obtenido a partir de células tumorales ováricas y endometriales) en tiroides, Cordón Cardo (51).

Anticuerpo MF116, sintetizado a partir de carcinoma ovárico, que aparece positivo además de carcinoma ovárico en carcinoma de pulmón y carcinoma renal.

Anticuerpo MH99, sintetizado a partir de carcinoma ovárico, aparece positivo en esófago, cervix, epidermis, teratomas además de en tumores ováricos.

Anticuerpo MH99, sintetizado a partir de carcinoma ovárico, aparece positivo en epitelio secretor normal, glándulas endocervicales y endometriales, epitelio ductal, cáncer de mama, epitelio gástrico e intestinal, epitelio transicional de la vejiga y endometrio.

b) CA-125 que aparece positivo además de en tumores ováricos en cáncer de mama pulmón y riñón (141) y (140).

c) Bast sólo encuentra positivo el CA-125 en melanoma ,fuera de los tumores ováricos (16).

d) Positividad para el CEA en el mesotelioma y carcinoma de pulmón además de en el 75% de los tumores mucinosos (119).

e) Positividad del OCAA-1 en el 90% de los tumores ováricos pero también se encuentra positivo en carcinomas cervicales, endometriales, de colon, de mama y de páncreas (70).

III. 4.2. Diferente comportamiento de un anticuerpo en tumores ováricos del mismo origen.

Kabawat (141) demuestra la falta de secreción de CA-125 de forma constante en tumores mucinosos tanto benignos, "borderline" y malignos.

En oposición al CA-125 reacciona con tumores serosos de células claras y endometrioides, hecho que diferencia desde el punto de vista inmunológico a los tumores mucinosos del resto de los tumores epiteliales.

Esta diferencia entre tumores mucinosos y el resto de los tumores epiteliales ya había sido sugerida por Scully en 1977 (208) basándose en datos puramente morfológicos.

Bhattacharya en 1982 (23) también evidencia esta diferencia utilizando otro anticuerpo monoclonal, el ID3 ,marcador oncofetal que reacciona frente al cistoadenocarcinoma mucinoso y no frente al resto de los tumores ginecológicos.

Estos dos anticuerpos nos presenta una diferencia inmunológica entre los tumores mucinosos y el resto de los tumores epiteliales ováricos.

Las reacciones con otros marcadores tumorales no ofrecen este mismo comportamiento en su expresión diferenciador entre tumores mucinosos y el resto de los tumores ováricos. En la Alfa-2 glicoproteína, Pregnancy specific Beta 1 glicoproteína y HCG son positivas tanto en tumores mucinosos como serosos y endometrioides (57).

En 1975 Van Nagell utiliza el CEA para el estudio de tumores ováricos encontrando diferencia en la expresión entre diferentes tumores epiteliales ováricos. Encuentra el CEA positivo en un 75% de los adenocarcinomas mucinosos y CEA 100% negativo en los carcinomas serosos. Esta es otra prueba del diferente comportamiento inmunológico de dos tipos de tumores clasificados dentro del mismo grupo en base a su origen epitelial.

III.4. 3. Aparición de antígenos tumorales en tejidos sanos.

Blaustein 1981 (25) demuestra anticuerpos marcadores de antígenos tumorales en tejidos sanos. Demuestra en quistes de inclusión ováricos en tejidos sanos CEA, HCG1, SP1, SP3 y HPL.

El antígeno H en células endometriales normales, aunque con expresión más débil que en tejidos fetales y en carcinoma de endometrio (129).

Encontramos también CEA positivo en epitelio gástrico normal (13).

III.4.4. Antígenos tumorales en tejidos benignos o borderline.

CEA positivo en tumores epiteliales benignos y borderline serosos (119). CEA, B-HCG, LP, SP1 SP3 positivos en cistoadenomas serosos (25).

III.4.5. No uniformidad en el reconocimiento de determinados tipos de tumor.

En la práctica totalidad de los trabajos revisados no se obtiene en el 100% de las muestras positividad frente a un marcador tumoral en un mismo tipo de tumor.

La negatividad en el 100% de tumores de un determinado tipo frente a un determinado antígeno si es más frecuente.

De lo que podemos concluir que la distribución de los marcadores tumorales no tiene homogeneidad en su distribución o que en determinados tumores puede estar presente el antígeno estudiado pero no en cantidades suficientes para ser distinguidos con las técnicas disponibles.

Esta característica de los mayores marcadores tumorales obligan en general a tener que utilizar una batería de anticuerpos para el diagnóstico diferencial de los tumores.

III.4.6. No uniformidad en la aparición de antígenos tumorales dentro del tejido estudiado.

Resulta curioso observar que en la inmensa mayoría de los trabajos publicados con técnicas de inmunohistoquímica no se

expone la distribución de las reacciones positivas antígeno anticuerpo dentro de los tejidos estudiados.

En algunas publicaciones donde este dato esta recogido encontramos que por ejemplo en quistes de inclusión ováricos (en ovarios normales) aparece un marcador tumoral sólo en algunos de ellos, Blaustein 1982 (25). Otro ejemplo son los cistoadenomas papilares que en algunas zonas del tumor expresan una reacción intensa positiva mientras que en otros no se marcan con marcadores como, LP, CEA, B-HCG, SP1 SP3 (141).

En algunos casos se ha encontrado correlación entre la morfología del tumor y la distribución del anticuerpo, como en el caso de tumores endometrioides en que se encuentra que las áreas positivas coinciden con las áreas de metaplasia escamosa.

Esto sugiere que un factor en esta variación antigénica estaría relacionado con la diferenciación (141) (16).

III.4.7. Utilidad para la clasificación anatomopatológica de los tumores.

La adopción de una clasificación y nomenclatura uniforme por la FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) y de la WHO (World Health Organization) a permitido establecer mejor el estadio y diagnóstico de tumores ováricos (130) (214).

En el futuro el uso de anticuerpos monoclonales tanto en anticuerpos que funcionan como marcadores tumorales así como de anticuerpos que sirven para definir el patrón antigénico del tumor ayudarán a la clasificación de los tumores ováricos (51).

El estudio con anticuerpos monoclonales será de gran utilidad para la evaluación y diagnóstico diferencial de tumores pobremente diferenciados.

La estrecha y reproducible especificidad de péptidos, carbohidratos y/o estructuras lipídicas permitan el reconocimiento con detalle de los constituyentes antigénicos de los tejidos, algunos de los marcadores tumorales pueden indicar

el origen del tumor o tener importancia en cuanto al pronóstico o la terapéutica (141).

Hasta la fecha en relación con los tumores epiteliales ováricos se precisa de la utilización de varios marcadores tumorales para la identificación del tipo de tumor, desde el punto de vista inmunológico dado que la mayoría de los resultados se basan tanto en la negatividad frente a determinados anticuerpos como en la positividad frente a otros (141) (236).

También ha sido útil la utilización de anticuerpos monoclonales para el diagnóstico diferencial entre tumores ováricos epiteliales y mesoteliomas (211).

III.4.8. No hay diferencias en los patrones de distribución antigénica entre los tejidos metastásicos y el tumor primario.

Lo que tiene gran utilidad para el diagnóstico de un tumor primario no detectado clínicamente a partir del estudio de la metástasis (141).

III.4.9. Ayuda en el diagnóstico pero les falta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico patológico definitivo.

El estudio de la antigenicidad de los tumores está en sus inicios y un mejor conocimiento del mismo nos ayudará a conocer la biología del tumor y a encontrar marcadores más específicos para la clasificación de los mismos.

No se ha encontrado correlación, en general entre la reacción con un determinado anticuerpo tumoral, o marcador antigénico con el grado o estadiage del tumor.

TABLA III.4. 1

Sumario de la reactividad con el OC 125 en tumores serosos malignos y borderline de acuerdo con el grado y el estadio.

Tumores	OC 125-Positivo/Total de casos
Borderline	2/2
Grado II	12/15
Grado III	7/8
Estadio I	3/3
Estadio II	1/2
Estadio III	14/16
Estadio IV	3/4

Nota: Tomado de (141) Kabawat. 1983.

Como vemos en la Tabla III.1 el OC 125 es un ejemplo de marcador tumoral que se expresa de forma indiferente en los tumores serosos ováricos, respecto a su grado de diferenciación.

III.4.10. Algunos anticuerpos desarrollados contra células tumorales han demostrado no ser "tumor específico" pero tienen reactividad con estructuras de carbohidratos como los antígenos del grupo sanguíneo ABO.

Estos anticuerpos han conseguido avances en el estudio de los glicoconjugados superficiales de las células.

Está ampliamente aceptado que los glicoconjugados superficiales celulares pueden estar alterados en algunas transformaciones malignas (129).

Los primeros estudios para la localización de los antígenos ABO utilizaron técnicas de aglutinación celular (68) (113), técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos policlonales (51) (160), y más recientemente los estudios con anticuerpos monoclonales (15) (142) han facilitado la reproductividad de los hallazgos.

Investigaciones con estos antígenos han sido realizadas en diferentes tumores:

- Tumores gastrointestinales (68) (71) (205) (251) (257).
- Tumores vesicales (61) (139) .
- Tumores del tracto genital femenino (67) (113) (230) (234).

III.4.11. Posibilidad de valoración pronóstica con anticuerpos monoclonales.

La presencia o ausencia de determinados antígenos puede permitir la mejor clasificación y pronóstico tanto en tumores del tracto genital femenino como en otro tipo de tumores como linfomas (179) y leucemias (201).

III.4.12. Ayuda en el diagnóstico citológico del líquido ascítico para la detección del tumor primario.

Anticuerpos que definirían el tipo celular del tumor primario han sido hallados en estudios inmunohistoquímicos de líquidos ascíticos tumorales aumentando el índice de diagnóstico respecto a la utilización de técnicas ascitológicas convencionales, ayudando esto tanto a la búsqueda del tumor primario como al estadiage del proceso tumoral (16).

III.4.13. Diferencia en la expresión de anticuerpos tumorales en tejidos adultos sanos y tejidos fetales.

Según se han ido realizando estudios con determinados anticuerpos se ha visto que muchos de ellos se comportan como marcadores oncofetales.

Estudios preliminares de Song y Kabawat, indican que el OC125 reacciona con glicoproteínas de 110 Kd. presentes en trompa fetal pero no en la superficie epitelial ovárica, no encontrando expresión del OC 125 en la trompa ni en el ovario adulto.

Se cree que el OC 125 detecta un antígeno Mulleriano relacionado con la citodiferenciación que se expresa en algunas tumores epiteliales malignos y en la trompa fetal pero no en el ovario adulto sano o fetal.

Blaustein publica la no expresión de LP, B1 glicoproteína y Alfa 2 glicoproteína en quistes de inclusión ováricos en un estudio en ovarios desde la 5ª semana hasta los 7 años, estos hallazgos correlacionados con los hallazgos en quistes de inclusión en ovarios adultos sanos y en tumores malignos ováricos (26), (25).

III.5. UTILIDAD DE LA TIPIFICACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS TEJIDOS.

Como ejemplo de la utilidad del empleo de técnicas de inmunohistoquímica tenemos un resultado documentado por trabajos sobre la posibilidad de reclasificación de tumores.

De los estudios inmunopatológico de tumores epiteliales llama la atención que existen datos para considerar a los tumores mucinosos dentro de un subgrupo independiente del resto de los tumores epiteliales, dado que su comportamiento inmunológico está bastante bien diferenciado del resto de los tumores epiteliales.

Varios autores apoyan que la ampliación en el conocimiento inmunohistoquímico de tumores ováricos llevarán a una reclasificación de los mismos.

Hay datos que apoyan que posiblemente algunos de los tumores mucinosos no deriven del epitelio celómico:

1. Kabawat (141) encuentra falta de expresión del OC 125 en todos los tumores mucinosos ováricos estudiados con el en contraste con la positividad al OC 125 del resto de los tumores epiteliales ovaricos. Sugiere Kabawat en este trabajo la pertenencia de los tumores mucinosos a un subgrupo específico dentro de los tumores epiteliales ováricos.

2. Scully 1977 (208) basándose en hallazgos morfológicos ya sugiere que algunos tumores mucinosos no deriven del epitelio superficial ovárico.

3. Bhattachaya 1982 (23) describe un nuevo anticuerpo monoclonal obtenido con inmunización de ratón con estrato de cistoadenocarcinoma ovárico, obteniendo un anticuerpo IgG 1 con cadena k, demostrable solo en el cistoadenocarcinoma mucinoso ovárico. No se han encontrado reacciones con otros tumores ginecológicos o no ginecológicos, ni en tejido adulto sano, sólo se ha demostrado la positividad de este anticuerpo fuera de los tumores malignos mucinosos en tejidos intestinales fetales.

Este estudio de Bhattachaya aporta también más datos respecto a la diferencia de los tumores mucinosos con el resto de tumores ováricos.

•

El basar el trabajo de esta tesis en el estudio inmunopatológico del tracto genital femenino y fundamentalmente del epitelio ovárico se fundamenta en la aceptación general de

que la mayoría de los tumores ováricos que se desarrollan en el adulto tienen su origen en el epitelio germinal que recubre la superficie del ovárico y en los quistes de inclusión (208) (16) (141).

Esta relación ha llevado a diferentes investigadores a realizar estudios comparativos entre tejidos tumorales y sanos frente a los distintos anticuerpos tumorales que se han ido experimentando.

Este estudio evolutivo de tejidos fetales adultos y tejidos tumorales, tanto benignos como malignos ha ocasionado hallazgos de gran importancia diagnóstica y pronóstica en la terapéutica.

De estos estudios se obtiene una información que aunque por el momento no puede tener una implicación clínica demasiado importante dado que se encuentran en una fase inicial parece seguro que en un futuro, a medio o largo plazo, la información obtenida con este tipo de trabajos estudiando las características antigénicas de los diferentes tejidos con anticuerpos monoclonales contribuirá, como consecuencia de un mejor conocimiento de la biología tumoral, a una mejor clasificación de los tumores ováricos con su correlación en la mejoría del tratamiento y la valoración clínica de dichos tumores.

Los anticuerpos monoclonales serán también en un futuro utilizados de forma amplia en la terapéutica antitumoral, contribuyendo a llevar el agente terapéutico directamente a las células afectas por el proceso tumoral y no al resto de las células sanas.

Contribuirán sin duda a mejorar el diagnóstico precoz consiguiendo la localización del tumor en fases iniciales con anticuerpos tumorales específicos para determinado tipo de tumor marcado con isótopos radioactivos.

El estudio con anticuerpos monoclonales de diferentes antígenos celulares ha abierto un nuevo campo dentro del estudio del desarrollo.

La embriología dispone de estas nuevas técnicas para ampliar o bien para confirmar hallazgos realizados con estudios morfológicos.

Un nuevo concepto como es el de la "inmunodisección" hace posible la ampliación del conocimiento del desarrollo embriológico y fetal.

Es evidente que existe un interés en encontrar una correlación de determinados procesos patológicos o no a lo largo del desarrollo evolutivo, esto lleva a muchos de los investigadores a buscar respuesta profundizando en el conocimiento de los tejidos embrionarios y fetales.

•

El estudio de los tejidos fetales ha llevado en el caso de los quistes de inclusión ováricos a cambiar conceptos asumidos al observar solo tejidos adultos.

Se asumía (40) que los quistes de inclusión observados fundamentalmente en mujeres pre y post-menopáusicas provenía de la invaginación profunda del epitelio celómico que con la edad resultaban en quistes de inclusión.

Con la revisión de Blaustein de 130 fetos (26) observó que estos quistes aparecían ya a las 12 semanas de gestación.

Blaustein sugiere que habría dos tipos de quistes de inclusión:

- 1) Quistes de inclusión ocurridos durante el desarrollo fetal a partir del primitivo epitelio celómico.

- 2) Quistes de inclusión incurridos en la edad adulta a expensas del epitelio maduro.

También se ha observado quistes de inclusión en mujeres de 1 a 30 años descartando la idea de que estos quistes eran productos del envejecimiento.

La presencia de antígenos tumorales en células epiteliales de los quistes de inclusión sugiere a Blaustein que este epitelio no está bien diferenciado o que incluso es indiferente tal y como sugiere Grunwald (112).

Algunas células de los quistes de inclusión elaboran los mismos marcadores que los cistoadenomas o que los cistoadenocarcinomas.

Esta observación no prueba el origen de los tumores a partir de los quistes de inclusión, pero si demuestra unas características comunes entre los tres.

*

Los siguientes puntos ilustran la utilidad de la tipificación antigénica de los tejidos con anticuerpos monoclonales:

- La tipificación antigénica puede contribuir al conocimiento del origen de los tumores y a su reclasificación (por ejemplo, los tumores mucinosos dentro de los tumores epiteliales ováricos).

- Algunos anticuerpos monoclonales como los URO 1, 5, 8 y 10 (marcadores de tejidos renal y urotelial) pueden servir para esclarecer el origen de tumores como el tumor de Brenner que algunos autores relacionan con algún posible origen renal por su morfología, aunque presumiblemente deriven del epitelio ovárico, dada la estrecha relación embriológica del aparato genital y urinario, parece útil el estudio de la expresión comparativa de estos anticuerpos en los epitelios del tracto genital femenino y del tejido renal y urotelial, investigando una posible relación en el comportamiento antigénico de ambos tipos de tejidos (tracto urinario y tracto genital).

- Respecto a los tumores epiteliales malignos también parece útil el estudio con estos marcadores para el esclarecimiento de tumores como el de células claras, descrito

por Schile 1939, como mesonefroma ovárico indicando un posible origen de este tumor en restos mesonéfricos.

Aunque Scully en 1967 estableció que estos tumores no eran de origen mesonéfrico sino mulleriano, el estudio comparativo con anticuerpos monoclonales frente a tejido renal y urotelial y el comportamiento de estos anticuerpos en estos tumores también podría ser de utilidad para contribuir al esclarecimiento del origen de los mismos. Este estudio tiene el inconveniente de precisar muestras de estos tumores en congelación, lo que no permite en general estudios retrospectivos.

*

Hasta aquí hemos revisado características generales y problemas en el empleo de marcadores tumorales.

Hemos revisado hasta ahora los anticuerpos que más se han empleado en la clínica, y de los que mas datos se han obtenido . En los últimos años han ido apareciendo una serie de anticuerpos que identifican, los Filamentos Intermedios (FI) y otros antígenos tisulares asociados, como el EMA, El CAM 5.2, el PKK1, el AE1/AE3, la Vimentina , la Desmina, la Alfa-1-antitripsina, el S-100, el Factor VIII, y los UROS.

La mayoría de estos anticuerpos se han empleado hasta el momento, fundamentalmente en investigación. Pero al ir ampliandose la experiencia con los mismos y dado el amplio campo de posibilidades que presentan, no sólo para el mejor conocimiento de la biología de los tejidos y para el estudio del desarrollo embrionario, sino para la inmunopatología se iran introduciendo en el trabajo clínico.

Los resultados positivos obtenidos con los marcadores tumorales ya experimentados en clinica y el hecho de que existen datos sobre algunos de los anticuepos enumerados que apoyan el hecho de que se comporten en algunos tejidos como marcadores tumorales,

nos pareció que merecía la pena investigar sobre los mismos en el tracto genital femenino y en los tumores epiteliales ováricos. Los datos obtenidos de la revisión bibliográfica, que se presentan con amplitud en el capítulo IV.4, nos apoyaron en la idea inicial de que el conocimiento del perfil antigenico desde el feto, al adulto y a los tumores epiteliales ovaricos, podria ser de utilidad, para mejorar el conocimiento de la biologia de estos tejidos y de histogénesis de los mismos. Son muchos los investigadores en este campo, que ven en los anticuerpos monoclonales una puerta abierta con amplias posibilidades para mejoras los resultados en la oncología.

No son muchos los estudios realizados hasta el momento sobre el estudio de un perfil antigénico del tracto genital femenino, habiéndose obtenido en algunos casos resultados contradictorios.

Por tanto nos planteamos el presente estudio con un amplio panel de anticuerpos monoclonales, podria ser interesante, para ampliar para ampliar el conocimiento del perfil antigénico del tracto genital femenino en el desarrollo, tanto del tejido normal como neoplásico.

CAPITULO IV

ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

IV ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

En este capítulo se realizará una puesta al día de los temas relacionados con el objeto de este trabajo.

El capítulo se ha dividido en cuatro apartados:

- 1) Embriología ovárica.
- 2) Histología funcional ovárica.
- 3) Técnicas de inmunohistoquímica.
- 4) Revisión bibliográfica sobre los anticuerpos monoclonales empleados en el estudio.

Dado que cada uno de los temas enumerados son de gran amplitud en esta revisión se ha intentado revisar aquellos aspectos más en relación con el objeto de este estudio.

Esta revisión sirvió de base al planteamiento de este trabajo y servirá de referencia para la discusión del problema.

IV. 1

EMBRIOLOGIA DEL APARATO GENITAL FEMENINO

IV. 1 EMBRIOLOGIA DEL APARATO GENITAL FEMENINO

IV. 1. 1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo haremos una breve revisión del desarrollo del aparato genital femenino como base al estudio evolutivo de la expresión de los filamentos intermedios y del resto de los anticuerpos incluidos en este trabajo, dirigido fundamentalmente, al estudio evolutivo de los diferentes epitelios del tracto genital femenino.

Los diversos epitelios de superficie del ovario, de la trompa, del cuerpo uterino, del cérvix y de la parte superior de la vagina (con la posible reserva de este último, que se comentará más adelante) originariamente derivan del mismo epitelio, el epitelio celómico (8), (117), (14), (6).

A pesar de este origen común muestran una gran divergencia en su citodiferenciación, sobre todo en su diferenciación neoplásica. En tejidos normales se produce a partir del epitelio celómico común una diferenciación en epitelio cuboidal, columnar, ciliado mucinoso y epitelio escamoso en varios órganos del tracto genital femenino.

Con excepción de este epitelio escamoso, estos epitelios son simples formados por una única capa de células o bien forman criptas y glándulas con un epitelio complejo y pseudoestratificado.

Las neoplasias epiteliales derivadas de epitelios del tracto genital femenino muestran frecuentemente una composición muy heterogénea y pleomórfica.

No es inhabitual encontrar en una neoplasia elementos epiteliales pertenecientes a un órgano diferente de aquel en el que el tumor está presente.

Revisaremos también la interrelación entre el desarrollo del aparato genital femenino y el del aparato urinario, dado que en el estudio se investigan anticuerpos en el aparato genital femenino., definidos en principio como anticuerpos específicos de tejido renal y urotelial .

El conducto Müllleriano, que en el embrión se desarrolla a partir de una invaginación retroperitoneal del epitelio celómico, da lugar al desarrollo de los oviductos, el cuerpo uterino ,y probablemente del cérvix y a la parte superior de la vagina.

Existen dudas sobre el origen de las dos últimas estructuras mencionadas, que algunos autores consideran ser de origen mesonéfrico más que de origen Müllleriano (153).

El ovario, que no deriva del conducto Müllleriano, está cubierto por mesotelio peritoneal, que en el embrión está representado por el epitelio celómico, a partir de cual se desarrolla el epitelio de los conductos Mülllerianos.

IV.1 . 2 DESARROLLO DE LAS GÓNADAS

El sistema reproductor se desarrolla en íntima asociación con el sistema urinario.

Durante la 5ª semana los gonocitos emigran dentro del mesenterio dorsal y alcanzan la región lumbar.

El epitelio celómico que recubre la cara anterointerna del cuerpo de Wolff se engruesa para formar la Cresta genital, que suministrará la células nutritivas a la gónada (219) (117) (14) (6).

En la 6ª semana los gonocitos invaden las crestas genitales, provenientes del endodermo del Saco Vitelino, pasando dorsalmente a través del mesénquima de la raíz del mesenterio (117).

A partir de la invasión de las crestas genitales por los gonocitos, estas proliferan dando lugar a los cordones sexuales, que serán los cordones medulares en la mujer.

En este estado el desarrollo es el mismo tanto si se va a formar un ovario, como un testículo.

Los cordones sexuales continuarán proliferando y anastomosándose dentro del mesénquima dando lugar a la rete.

Este esbozo gonádico hace prominencia debajo del epitelio celómico, en la cara antero interna del cuerpo de Wolff. Figura IV .1. 1.

La rete se anastomosa con la parte adyacente de los túbulos contorneados mesonéfricos, de esta manera se establecen las primeras conexiones urogenitales (219) Figura IV .1. 2.

Gillman (1948) (104) afirma que las células de la granulosa y probablemente las células de Sertoli provienen del epitelio celómico de las crestas gonadales. Las células de la teca provienen según Gillman de células modificadas del estroma, de origen mesenquimal, también confirmó este autor que las células germinales provenían de fuera de la gonada primordial.

IV. 1. 3 . DIFERENCIACIÓN DEL OVARIO

Morfológicamente el ovario es reconocible más tarde que el testículo.

Se puede diferenciar a partir de la 7ª semana (14).

Un hecho importante en el desarrollo del ovario es el progresivo aumento en tamaño de la corteza a expensas de la médula.

Los primeros folículos, compuestos por ovocitos rodeados por células de la granulosa aparecen inicialmente en la parte central del ovario con una longitud craneo caudal de 150 mm. (5 meses lunares) (14).

Córtex primario: formado por pequeños acúmulos celulares de proliferación muy temprana que rodean la oogonia derivada de las células primordiales germinales.

Córtex secundario: formado por elementos del córtex primario y por la proliferación adicional del epitelio germinal. Algunos folículos aparecen como vesiculares durante la vida fetal pero degeneran al nacimiento (6).

Hacia el 2º mes el mesonefros regresa, los glomérulos desaparecen, quedando la gónada suspendida de la pared dorsal por el mesenterio urogenital, y en su parte craneal y caudal por ligamentos provenientes del degenerado mesonefros (219). (6).

Algunos túbulos medulares localizados en el hilio del ovario, e incluso acompañados por algunas células germinales, pueden encontrarse en fetos hasta los 8 meses. Estos restos medulares pueden estar implicados en el desarrollo de tumores virilizantes en la mujer adulta (6).

IV. 1. 4 . FACTORES QUE INFLUENCIAN LA DIFERENCIACIÓN GONADAL

* En estadio prenatal la diferenciación de las gónadas es independiente de la presencia o ausencia de células germinales, en ambos sexos.

En la etapa post-natal el desarrollo somático del ovario y del testículo difiere.

Si en el ovario faltan las células germinales no es posible la diferenciación de células productoras de esteroides y se impide el correcto funcionamiento de la maduración folicular (178).

* Es conocido el papel del antígeno H-Y en la diferenciación gonadal.

En el humano normal la hembra 46, XX se define como H-Y negativo.

U. Wolf publica (252) que parece cada vez más claro que la información estructural para el antígeno H-Y está presente en el genoma de ambos sexos, y que la diferencia de sexo es básicamente debida a la acción de genes controladores localizados en los cromosomas sexuales.

▪ PAPEL DEL MESONEFROS EN EL DESARROLLO GONADAL:

Durante el desarrollo embrionario, el sistema renal está representado por tres estructuras, el pronefros, el mesonefros y el metanefros.

El pronefros y el mesonefros son estructuras transitorias, siendo parte de sus ductos utilizadas en el sistema urinario y genital.

El metanefros induce la formación del riñón definitivo (7).

+ Wartenberg (1981) (249) publica que tras diferentes estudios en mamíferos el papel importante del mesonefros en el desarrollo gonadal es evidente. De sus estudios, concluye :

- El mesonefros participa en el desarrollo gonadal independientemente de su propia diferenciación o estado funcional.

- El mecanismo de interacción mesonefro-gónada es distinto en las diferentes especies.

- Algunas observaciones apoyan la idea de que células de origen mesonéfrico llegan a ser constituyentes del estroma mesonefrico o de otras partes del aparato genital femenino.

- El blastema mesonéfrico parece tener un papel director, influenciando un segundo blastema presente en los cordones genitales: las células derivadas del epitelio superficial.

_ El blastema mesonéfrico ejerce un papel inductivo y organizador sobre la superficie epitelial.

- En la gónada indiferenciada, que consiste en una mezcla de de origen epitelial y del cordón mesonéfrico, la diferenciación sexual se basa en una organización dissimilar entre los dos componentes, que resultará en una estructura masculina o femenina.

Durante la diferenciación en sentido femenino, las células del mesonefros no consiguen penetrar en el núcleo del blastema. Consecuentemente los cordones epiteliales mantienen su conexión con las células del epitelio superficial .

Si se forma el córtex secundario el blastema mesonéfrico intentando invadir la superficie epitelial , representa el mecanismo básico para la diferenciación del córtex ovárico.

+ Upadhyay (1981) (241) de sus estudios en ratones concluyen ,que al menos en esta especie la influencia del mesonefros en la diferenciación gonadal es igual en ambos sexos.

+ Zamboni (258) demuestra en ovejas la migración a la gónada indiferenciada de células desde el mesonefros.

+ Sobre la influencia del mesonefros en el inicio de la meiosis hace Grinsted una revisión bibliográfica en 1981 (110). En su revisión, este autor recoge opiniones publicadas apoyando la idea de que el mesonefros secreta una sustancia inductora de la meiosis, el MIS.

También recoge este autor información apoyando que el inicio de la meiosis ocurre cuando cesa la función renal del mesonefros.

De los datos de la literatura revisados se puede concluir que existe una íntima interconexión entre el desarrollo del

aparato urinario y genital y que células del mesonefros es posible que llegen a formar parte del tracto genital femenino.

IV. 1. 5. DIFERENCIACIÓN DE LOS CONDUCTOS GENITALES FEMENINOS

- Los conductos de Wolff sirven como conducto excretor transitorio, y parte de sus ductos son posiblemente utilizados en los definitivos conductos genitales.

Los conductos mesonéfricos preceden a la gónada en su desarrollo, estando estos completamente establecido cuando la gónada primitiva comienza a diferenciarse (7).

Los túbulos mesonéfricos daran lugar, en el desarrollo femenino a (8) :

- Epooforo. Estructura que permanece como vestigio.
- Paraoforo. Estructura que permanece como vestigio.
- Conducto de Gartner. Este conducto representa la porción terminal del mesonefros.

- Los conductos de Müller se forman en el embrión de 10 mm., partiendo de una invaginación del epitelio celómico, enfrente y por fuera de la extremidad craneal de cada uno de los conductos de Wolff.

Se constituye un mamelón epitelial compacto que se hunde en el mesénquima y progresa en dirección caudal siguiendo por fuera el conducto de Wolff.

Se produce una fusión en la parte terminal de su trayecto. De esta unión resulta un conducto impar y medio, que se apoya en la cara posterior del seno urogenital, entre los dos orificios de los conductos de Wolff, determinando, el tubérculo de Müller, si bien existen otras teorías que no apoyan este criterio .

Hacia la 7ª semana las vías genitales tienen el mismo aspecto, contienen dos conductos de Wolff y dos conductos de Müller (219).

Hacia la 8ª semana el segmento inferior del conducto de Müller, por debajo del cruce con el ligamento inguinal, se fusiona con su homólogo opuesto, para formar el conducto uterovaginal.

Esta fusión se produce en la parte distal y progresa hasta el futuro cuerno uterino. El tabique medio desaparece al final del tercer mes.

La parte superior del conducto uterovaginal suministrará el epitelio de la mucosa uterina.

En la vaina conjuntiva resultante de la fusión de los dos cordones urogenitales tendrá su origen el miometrio (219).

A partir del conducto de Müller se forman virtualmente todos los conductos definitivos femeninos:

* Trompa : La porción de cada uno de los conductos de Müller que queda situado por encima del cruce del ligamento inguinal con el cordón urogenital, da lugar a la trompa uterina en cada uno de los dos lados.

El orificio superior de conducto de Wolf dará lugar al pabellón de la trompa.

* Útero : Formado a partir de la fusión de los dos conductos de Müller, ya en párrafos anteriores se ha descrito este proceso.

* Vagina : Tanto Allan (8) como Solère (219) concluyen que la mayor parte de la vagina procede de los conductos de Müller, que concluye que los cuatro quintos superiores de la vagina son de origen mesoblástico y el quinto inferior es de origen entoblástico (seno urogenital). Barnes (14) en su libro "El desarrollo intrauterino" hace una revisión de distintos autores que defienden que la vagina se desarrollaría a partir del epitelio del seno urogenital .

Figura IV . 1. 1. (A)

Gónada indiferenciada en el momento de formación de la rete.
(Tomado de ' (219))

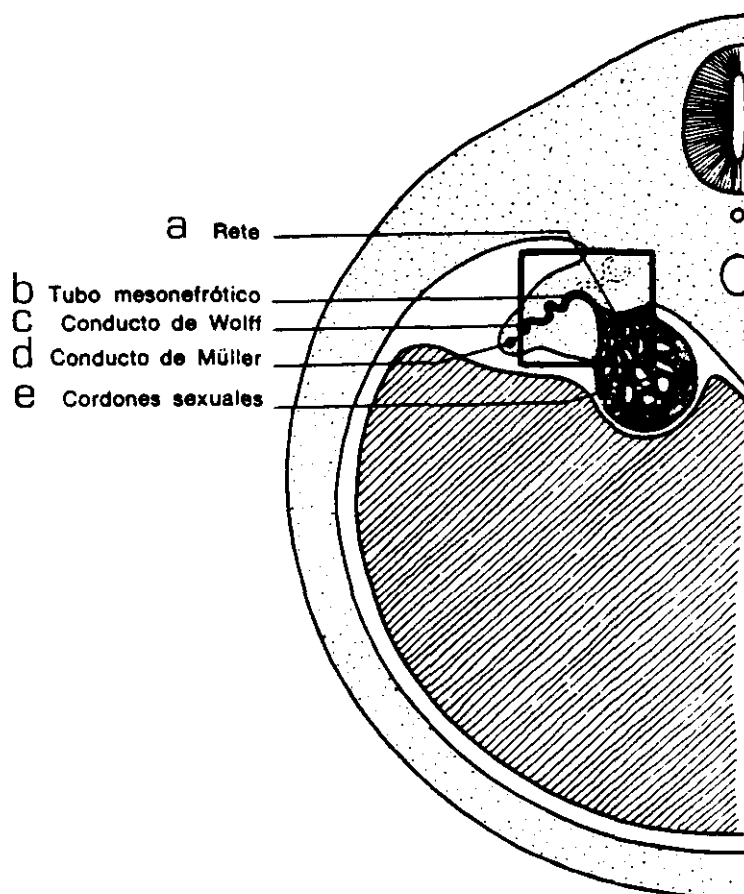
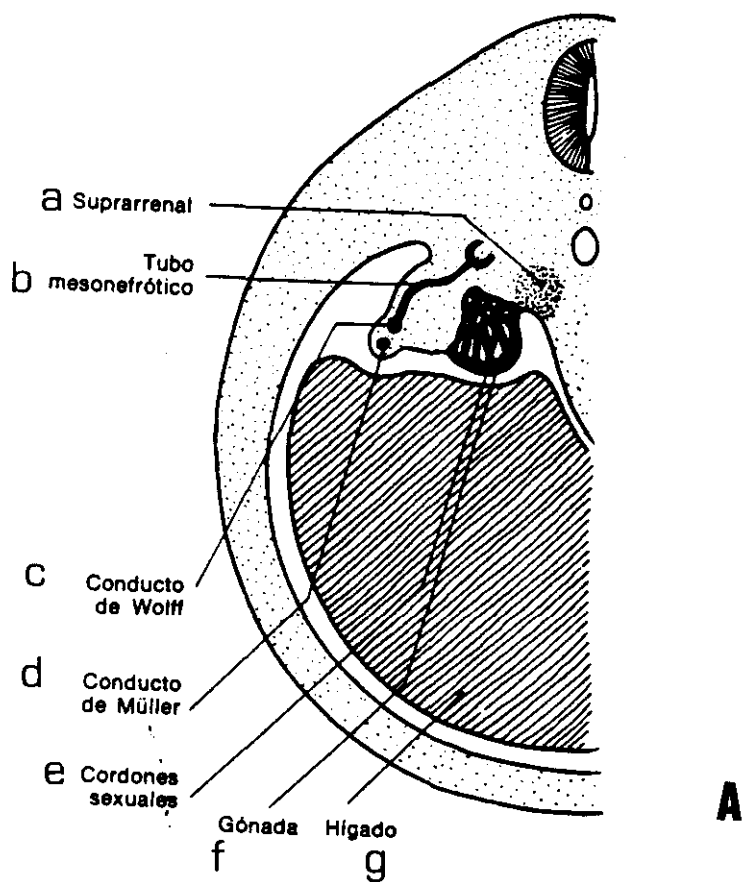
- a. Suprarrenal.
- b. Tubo mesonéfrico.
- c. Conducto de Wolff.
- d. Conducto de Müller.
- e. Cordones sexuales.
- f. Gónada.
- g. Hígado.

Figura IV . 1. 2. (B)

Gónada indiferenciada en el momento de la formación de las primeras conexiones urogenitales

(Tomado de (219))

- a. Rete.
- b. Tubo mesonéfrico.
- c. Conducto de Wolff.
- d. Conducto de Müller.
- e. Cordones sexuales.



IV. 2

HISTOLOGÍA FUNCIONAL OVÁRICA

IV.2. HISTOLOGÍA FUNCIONAL OVÁRICA

El hecho de dedicar un capítulo del trabajo a una revisión de la histología ovárica haciendo una puesta al día, de las estructuras y su relación con la función está justificado ya que el conocimiento de las estructuras histológicas ováricas servirá de apoyo a la parte experimental de este trabajo.

HISTOLOGÍA FUNCIONAL OVÁRICA:

- IV.2. 1) Anatomía ovárica
- IV.2. 2) Vascularización
- IV.2. 3) Linfáticos
- IV.2. 4) Inervación
- IV.2. 5) Superficie epitelial
- IV.2. 6) Estroma:
 - a) Células luteneizadas estromales
 - b) EASC
 - c) Células deciduales
 - d) Células endometriales estromales
 - e) Células grasas
 - f) Células de Leydig
 - g) Células "APUD type"
 - h) Células hiliares
 - i) Cambios con la edad
- IV.2. 7) Clasificación de células intersticiales

IV.2. 1) ANATOMÍA OVÁRICA

Los ovarios son órganos pélvicos pares situados en el dorso lateralmente a el útero, cerca de la pared pélvica, tras el ligamento ancho y anterior al recto. Cada ovario está unido por su margen anterior o hilio por una hoja doble de peritoneo, el mesovario, a la cara posterior de ligamento ancho. Cada ovario está unido por su polo medial al cuerno uterino ipsilateral por el ligamento uterovárico y por su polo superior a la pared

pélvica lateral por el ligamento infundíbulo-pélvico (o suspensorio).

IV.2.2) VASCULARIZACIÓN DEL OVARIO

La arteria ovárica sigue el ligamento infundíbulo pélvico, incorporándose al meso de la trompa desde donde emite ramas hacia el ovario y hacia las trompas (106).

En el ángulo entre la trompa y el útero se anastomosa con la arteria uterina.

Las venas acompañan a las arterias, en la médula son largas y tortuosas, drenan en el hilio y finalmente en la vena ovárica. La vena ovárica izquierda drena en la vena renal izquierda y la vena ovárica derecha drena en la cava inferior.

Unos diez arcos salen de la arteria ovárica y penetran en el hilio y la médula (106) (28), estas arterias tienen una capa íntima muscular longitudinal en toda su longitud (45).

En la unión córtico medular se forma un plexo y salen arteriolas corticales que penetran en el córtex de forma radial, observándose anastomosis entre ellas (200), estos capilares forman un denso entramado con la theca de los folículos ováricos.

En estudios en ratas se ha observado pequeños capilares en la proximidad de los folículos primordiales pero no una vascularización independiente.

Se ha observado un aumento de vascularización en relación con el desarrollo del cuerpo lúteo, objetivándose formación de nuevos capilares (229).

La red capilar en la teca aumenta alrededor de los folículos preovulatorios, lo que puede tener influencia en el acceso de las

gonadotropinas y/o en la habilidad de las células foliculares en responder a las mismas (56).

La vascularización es un factor temprano en la luténización, factores angiogénicos se han encontrado en el tejido lúteo y se ha comprobado que la prostociclina aumenta la vascularización en el cuerpo lúteo.

IV.2.3) LINFÁTICOS

Los linfáticos del ovario se originan predominantemente en las capas de la theca de los folículos. Las células de la granulosa y los folículos inmaduros están desprovistos de linfáticos en contraste con el cuerpo lúteo que posee una rica red linfática. Los linfáticos atraviesan el estroma independientemente de los vasos y van a drenar dentro de grandes troncos que forman un plexo en el hilio ovárico. De 4 a 8 canales atraviesan el mesovario convergiendo para formar otro plexo (plexo subovárico) formado también por ramas provenientes de la trompa de Falopio y del fondo uterino.

En la mayor parte del drenaje linfático del ovario se realiza en dirección hacia los nódulos paraórticos, aunque existen canales accesorios que hacen un by pass al plexo subovárico atravesando el ligamento ancho hacia la hiliaca interna, la iliaca externa y los nódulos linfáticos interaórticos, o vía del ligamento redondo hacia los nódulos inguinales linfáticos (45).

IV.2.4) INERVACIÓN

El aparato genital interno está inervado por sistema vegetativo autónomo a través del simpático y del parasimpático:

a) Las fibra simpáticas proceden de los últimos segmentos dorsales de la médula y de los segmentos lumbares.

A través de las raíces anteriores y de los rami comunicantes blancos penetran la cadena parasimpática vertebral desde originan dos importantes plexos:

- 1) Plexo uterovárico
- 2) Plexo hipogástrico

El plexo uterovárico originado fundamentalmente en los ganglios aórtico renal y mesentérico superior sigue el camino de la arteria ovárica e inerva el ovario, la trompa y el fondo uterino.

b) Las fibras parasimpáticas se originan en el plexo sacro y dan origen al nervio pélvico que terminan también al igual que las fibras simpáticas en el plexo de De Lee y Frankenhanser.

Investigaciones histoquímicas han demostrado terminales adrenérgicos en el ovario no sólo alrededor de los vasos, sino en la médula, corteza, tejido estromal y células intersticiales (39) (240) (229).

A estos hallazgos anatómicos se les ha implicado un papel funcional en la síntesis esteroideogénica del ovario.

Hay estudios en ratas para tratar de dar respuesta al papel de la inervación en la esteroideogénesis ovárica (143). Se ha demostrado en ratas que el estímulo del hipocampo cambia la producción de esteroides sin afectar a la secreción de gonadotropinas o a la de LHRH (63).

De este estudio realizado en ratas hipofisectomizadas en las que se estudian los cambios secretores en relación con la estimulación de diferentes zonas del cerebro no encuentran correlación entre el aumento de NE (Norepinefrina) en el ovario tras estímulo cerebral y la concentración esteroidea.

No se encuentra dopamina en los ovarios.

Tras la denervación ovárica se observa un aumento de FSH.

Masazumi Kawakami concluye de su estudio (143) que el sistema deferente neuronal del cerebro al ovario es suplementario al mecanismo cerebro pituitario hormonal ovárico. Este sistema

parece que juega un papel en el mantenimiento de la secreción ovárica más que un papel fundamental en el mismo.

Es conocido que una porción significativa de la inervación del ovario es adrenérgica (38). Estímulos beta-adrenérgicos producen un aumento de progesterona en los folículos y en el cuerpo lúteo (49), este efecto no se consigue con agonistas alfa-adrenérgicos (229), y es bloqueada por antagonistas beta-adrenérgicos (136).

Otras evidencias del papel de las catecolaminas en el control de la función ovárica:

- Bahz y Ben Jonathan encuentran una deplección ovárica de catecolaminas en relación con el aumento preovulatorio de gonadotropinas.

- Se han demostrado receptores beta-adrenérgicos en el cuerpo lúteo en ratas (135), así como en ratas puberales encontrando una cantidad significativa de receptores en la granulosa.

- Se ha sugerido que previa a la primera ovulación podría haber un cambio en el tono adrenérgico que podría facilitar la respuesta a las gonadotropinas (1).

- Se han evidenciado mínimas cantidades de epinefrina en el ovario que es fundamentalmente de origen adrenal.

- Se ha demostrado con microscopía electrónica terminales nerviosos adrenérgicos a 400 amstrom. de las células intersticiales y de las células endocrinas estromales en el cobaya.

- En estudios con técnicas de fluorescencia con el método de Falck y Hillap (38) (135) se han observado nervios conteniendo catecolaminas que emiten fluorescencia en la proximidad de los vasos y en el tejido vascular estromal, en un estudio comparativo se observó mayor inervación en el gato y menos en el humano y en el mono.

- En un estudio con técnicas histoquímicas para la detección de acetilcolinesterasa (con el método de tihocolina de Koelle) (245), se han evidenciado pocas inervaciones colinérgicas en el ovario.

IV.2.5) SUPERFICIE EPITELIAL OVÁRICA

El ovario está cubierto por epitelio simple, focalmente psudoestratificado, está constituido por células peritoneales modificadas.

Las células de este epitelio pueden ser planas, cuboidales o columnares, pudiendose encontrar las tres variedades en un mismo ovario (45).

Separando el epitelio del estroma se encuentra una membrana basal.

Por estudios histoquímicos se han demostrado en el epitelio glucógeno y mucopolisacáridos ácidos y neutros (28), así como actividades enzimáticas (hidroxiesteroide deshidrogenasa) ausentes en otro tipo de células mesoteliales.

El estudio del epitelio ovárico desde el punto de vista antigénico ha sido objeto de estudio por diferentes autores.

Benjamín E.1987 (19) realizan un estudio inmunohistoquímico con CAM 5.2. (Citoqueratina), con Desmina y con Vimentina. Encontrando positividad en la expresión del CAM 5.2. tanto en el epitelio ovárico adulto como fetal, en cambio encuentran diferencias en la expresión de la Vimentina que aparece en prácticamente todos los casos en el epitelio ovárico adulto, y sólo focalmente en el epitelio ovárico fetal (en estudios en parafina). En este trabajo no se objetivó expresión de la desmina ni en el feto, ni en el adulto.

La expresión de la Vimentina y de las citoqueratinas estudiadas por el CAM 5.2. tanto en el epitelio ovárico como en las células de la granulosa, tumores de la granulosa y rete ovarii , no implica necesariamente una relación entre las células de la granulosa y el epitelio ovárico de superficie, aunque este es un dato a tener en cuenta, marcando una diferencia antigénica al menos con las células de la teca y del estroma que sólo expresan vimentina, expresión típica de células mesenquimales.

Otros autores como Viale et al. (1988) (247) demuestran la expresión de la Vimentina y de las citoqueratinas en la superficie ovárica, encontrando estos autores que los diferentes tumores epiteliales mantienen el mismo patrón de filamentos intermedios, que el epitelio normal.

Del trabajo de Viale se obtienen datos importantes para la clínica como el que en metástasis abdominales de un tumor primario desconocido, la coexpresión de citoqueratina y Vimentina orienta a que el tumor primario sea de origen ovárico. Este dato, como ejemplo, pone de relieve la importancia de la tipificación de los FI en diferentes tejidos para la más precisa caracterización del origen y diferenciación de los tumores humanos.

Otros anticuerpo como el MH 99 y el OC 125 han sido utilizados por Cerdón-Cardo et al. (1985) (51) para el estudio del epitelio de superficie ovárico y de diferentes tumores.

Estos autores encuentran el OC 125 (anticuerpo obtenido por Bast et al. por inmunización de ratón con líneas celulares de Carcinoma de ovario 433) positivo en el endocervix, endometrio y trompa fetal y adulta, encontrando una expresión negativa del mismo en epitelio ovárico fetal y adulto. Encuentran positividad en la expresión del OC 125 en tumores epiteliales ováricos.

Estos autores encuentran reacción positiva para el MH 99 tanto en epitelio ovárico, trompa endometrio y endocervix, en adulto y en feto, encuentran esta misma reacción positiva en tumores ováricos epiteliales.

QUISTES DE INCLUSIÓN

Los quistes de inclusión derivan de invaginaciones del epitelio de superficie, invaginaciones que han perdido su contacto con dicho epitelio.

El diametro de 1 cm. ha sido sugerida como línea divisoria entre los quistes de inclusión y los pequeños cistoadenomas (207).

Aunque en principio se pensó que estos quistes eran típicos del ovario adulto, han sido reconocidos en ovarios desde la época fetal hasta la post-menopausia (24) (25) (26).

Varios autores han realizado trabajos para el estudio de los quistes de inclusión, buscando una posible relación entre los mismos y tumores epiteliales.

Blaustein (1981) (24) estudia los quistes de inclusión en ovarios fetales encontrando a las 12 semanas las células epiteliales superficiales, no observándose túnica albuginia que separe estas células del estroma.

Blaustein encuentra en el estudio del epitelio de recubrimiento de los quistes de inclusión ováricos en los fetos tres tipos de epitelio, epitelio plano, cuboidal y columnar. Demuestra que en un quiste se pueden encontrar los tres tipos de epitelio.

Se encuentran en este epitelio de recubrimiento, en fetos, calcificaciones como las descritas en quistes de inclusión en el adulto y en en cistadenomas. A los tres meses de vida fetal la superficie ovárica está mas diferenciada del córtex pero no se distingue la túnica albugínea. El epitelio de superficie puede estar focalmente estratificado, y se pueden apreciar agrupaciones celulares penetrando en el estroma cortical.

A las 16 semanas se pueden observar quistes de inclusión en el córtex, rodeados por células germinales y pregranulosas. Los núcleos la mayor parte de estas células epiteliales de recubrimiento, son hipercromáticos, aunque algunos tienen apariencia vesicular.

Estos quistes probablemente permanecen a lo largo de la vida adulta.

El mecanismo por el cual se producen estos quistes en la vida fetal es desconocido, aunque el origen puedan ser las profundas criptas que quedan englobadas en el estroma, al producirse un crecimiento del mismo. El epitelio que rodea los quistes de inclusión producidos en la vida fetal es por tanto un epitelio

multipotencial, en cambio el epitelio de los quistes de inclusión en la vida adulta sería un epitelio maduro.

Por su diferente origen y tipo de epitelio, se pueden diferenciar dos tipos de quistes de inclusión:

- Quistes de inclusión de origen fetal.
- Quistes de inclusión producidos en la edad adulta.

Los quistes de inclusión se distinguen de los quistes foliculares porque estos últimos están rodeados de theca interna o pretheca, y los quistes de inclusión sólo están rodeados de un denso estroma que semeja una túnica albugínea. También se distinguen de los ductos Wolffianos remanentes en el hilio ovárico, Blaustein (1982) (26).

Blaustein (26) en un estudio en quistes de inclusión desde la vida fetal hasta los treinta años observa que en la vida fetal y en la premenarquia el epitelio es más frecuentemente de tipo plano o cuboidal, encontrándose después de la menarquia con más frecuencia el epitelio endosalpingeal. Este hallazgo sugiere que la metaplasia de este epitelio se puede inducir hormonalmente. Alteraciones metaplásicas en los quistes de inclusión se han encontrado sólo después de la menarquia.

No se han realizado estudios enzimáticos en quistes de inclusión fetales.

En otro trabajo publicado en 1982 por Blaustein et al. (25) considerando los quistes de inclusión como posible origen de los tumores epiteliales del ovario hace un estudio comparativo con técnicas inmunohistoquímicas con HCG, LP, Alpha-2- glycoproteína (SP 3) y "pregnancy" beta -1 glycoproteína (SP 1), con técnicas de inmuno peroxidasa, en quistes de inclusión en ovarios adultos. En la Tabla IV.2.1. se resumen los resultados obtenidos en este trabajo.

TABLA IV.2. 1

ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO EN QUISTES DE INCLUSION
DE OVARIOS ADULTOS CON TECNICAS DE INMUNOPEROXIDASA
EN TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA

Quistes de inclusion recubiertos por:	CEA	HCG	LP	SP1	SP3
Epitelio plano y cuboidal	1/26	2/26	4/240/20	0/23	
Epitelio columnar:					
a) Endosalpingeal	2/141	4/141	56/116	5/118	2/118
b) Endometrial	1/15	0/15	0/7	0/7	0/7

Nota : Tomado de Blaustein 1982 (25).
El numerador indica los casos positivos sobre el total.

Blaustein describe producción de LP en los quistes rodeados fundamentalmente de epitelio endosalpingeal. Este marcador tumoral se encuentra también en los cistoadenomas Serosos Papilares y aún con más intensidad en los Cistoadenocarcinomas Serosos. La descripción del LP en cistoadenomas Serosos fue hecha por primera vez por Blaustein en este trabajo (26).

La presencia de estos marcadores tumorales en estos epitelios de los quistes de inclusión sugiere que se trata de epitelios no bien diferenciados como ya sugirió Grunwald (1942) (112).

El que el epitelio de los quistes de inclusión produzca los mismos marcadores tumorales que los cistoadenomas y que los cistoadenocarcinomas serosos no implica necesariamente una prueba del origen de estos tumores en los quistes de inclusión pero si demuestra que es una característica significativa común de los tres.

IV.2.6) ESTROMA

El estroma de la médula y el córtex son similares y se encuentran en continuidad. Las células estromales se encuentran separadas por un denso fondo reticular con variable cantidad de colágeno, más abundante en el córtex superficial (a esta zona superficial más abundante en colágeno se le llama habitualmente túnica albuginia).

Varios tipos de células se encuentran en el estroma probablemente derivadas de células fibroblásticas:

a) CÉLULAS LUTEINIZADAS ESTROMALES

Estas células se encuentran a distancia de los folículos en pequeños nidos más frecuentemente en la médula; son células poligonales con citoplasma eosinofílico y claro con variable cantidad de lípidos, con un núcleo central y un prominente nucleolo.

Según Battifora (Ref.de (56)) aumentan en el embarazo y en la menopausia probablemente secundariamente a niveles elevados de gonadotropinas. Estas células luteinizadas estromales pueden ser un hallazgo normal en ovarios adultos, y es más frecuente su hallazgo al aumentar la edad.

En mujeres jóvenes ciertos grados de luteinización estromal (hipertecosis estromal) están frecuentemente asociados a manifestaciones estrogénicas y androgénicas.

b) EASC (ENZIMATICALLY ACTIVE STROMAL CELLS)

Estas células están caracterizadas por su actividad oxidativa y enzimática, algunas células luteinizadas muestran también estas actividades. Estas actividades las encontramos también en células estromales no diferenciadas, con técnicas histológicas de rutina, de las células que las rodean.

Agrupamientos de estas células se han encontrado en el 59% de ovarios normales y son más frecuentes en la zona medular.

Estas células pueden ser precursoras de células luteínicas estromales.

También se han encontrado en tumores metastásicos ováricos.

Estos hallazgos histológicos aportan datos para considerar al estroma ovárico como un complejo tejido especializado y no como un simple soporte de la estructura ovárica (174).

c) CÉLULAS DECIDUALES

Estas células tienen una apariencia igual a las de la decidua eutópica, pero ocasionalmente pueden mimetizar a células metastásicas carcinomatosas.

Pueden aparecer solas o en pequeños nódulos en el estroma superficial, cerca de estas células aparecen capilares vasculares y capilares linfáticos.

Responden a un aumento de la progesterona, apareciendo a las nueve semanas en el embarazo en la enfermedad trofoblástica y en neoplasias ováricas hormonoproductoras.

También se han encontrado en mujeres pre y postmenopáusicas sin causa aparente.

d) CÉLULAS MUSCULARES

e) CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES

Habitualmente relacionadas con endometriosis estromal o estromatosis benigna se encuentran en casos no asociados a endometriosis.

f) CÉLULAS GRASAS

Encontradas en el estroma subcapsular con posible asociación a la obesidad (126).

g) CÉLULAS DE LEYDIG

Las células de Leydig son vistas aunque raramente, típicamente asociadas a hipertecosis o al estroma no neoplásico en neoplasias ováricas (225) (259).

h) CÉLULAS NEUROENDOCRINAS O "APUD TYPE"

Estas células se encuentran hasta en el 6% de mujeres normales (122).

Aparecen en pequeños grupos en las zonas corticomedulares y presentan argirofilia y argentofinia.

Su significado clínico es desconocido, pueden ser las células de origen de los raros tumores ováricos carcinoides no asociados con elementos teratomatosos o mucinosos (122). Estos hallazgos soportan la creencia del origen en la cresta neural de los carcinoides ováricos no asociados a teratomas o tumores mucinosos.

1) CELULAS HILIARES OVÁRICAS

Las células hiliares ováricas, idénticas a las células de Leydig (pero con dotación femenina) están presentes en la vida fetal pero no en la infancia, reaparecen en la pubertad y son demostrables prácticamente en todas las post-menopáusicas (224) (227).

Su número y localización son muy variables, en relación con el embarazo, la edad y el estado post-menopáusico. Aparecen más agrupaciones en el hilio cerca de la salida del ligamento ovárico. Característicamente envuelven nervios no mielinizados, menos comunmente se encuentran dentro del nervio separando fibras, se encuentran también en relación con venas y linfáticos hiliares, haciendo a veces protusión en la luz de los vasos. A veces rodean la "rete ovarii".

Los acúmulos de células hiliares no están encapsulados.

Estas células miden entre 15 y 25 micras, son redondas u ovaladas, con abundante citoplasma eosinofílico y núcleos vesiculares esféricos con uno o dos nucleolos.

Contienen cristales de Reinke, de 10 a 35 micras de longitud, en empalizada rodeados de un halo (estos cristales se visualizan bien tiñéndose en negro con hematosilina y/o en color magenta con la tinción de Masson). Aparecen también estructuras redondeadas de la misma apariencia de los cristales de Reinke que probablemente sean sus precursores.

Junto a las células hiliares se ven células intermedias y fibroblastos.

Las células hiliares e intermedias tienen uniones sinápticas con nervios, sugiriendo que su origen serían fibroblastos modificados bajo la inducción nerviosa.

Las células hiliares responden a la HCG endógena y exógena aumentando en tamaño y en número (227). El esteroide producido en mayor cantidad por estas células es la androstendiona (252).

j) CAMBIOS CON LA EDAD

Los cambios del estroma con la edad son variables, desde la atrofia del estroma cortical y reducción de la medular, hasta la marcada proliferación estromal confusamente llamada "hiperplasia estromal", por tanto es difícil tipificar la normalidad en los estromas post-menopáusicos.

Se encuentran áreas de fibrosis tanto en peri o post-menopáusicas llamados fibromas cuando miden más de 1 cm. (207), también aparecen cambios en la superficie hablando de papilaridad estromal cuando los papilomas tienen menos de 1 cm y de papilomas superficiales cuando tienen más de 1 cm.

Encontramos también que un 45% de mujeres a los 40 años tienen granulomas corticales (136)(31)(128), consistentes en acúmulos redondeados de células epiteliales, linfocitos y células gigantes multinucleadas y ocasionalmente se encuentran cristales grasos anisotrópicos.

Su histogénesis es incierta pero podrían representar focos en regresión de endometriosis estromal, decidua eutópica o células luteinizadas estromales (128), (84).

k) PRODUCCIÓN HORMONAL

Numerosos estudios han demostrado potencialidad para la producción de esteroides y respuesta a la gonadotropinas en el estroma ovárica pre y post-menopáusico (4), (137), (138), (246).

Con incubación "in vitro" se ha demostrado que los principales esteroides estromales en pre y post-menopáusicas son: androstendiona, testosterona y dehidroepiandrosterona (202).

Su producción se ha visto aumentada con el HCG, hallazgo consistente con la posible aparición de receptores LH en el estroma.

La proporción en la que contribuyen los andrógenos estromales al pool de andrógenos en pre y post-menopáusicas no está totalmente aclarado.

Con el cese de la actividad folicular el estroma se convierte en la mayor fuente de andrógenos junto con las glándulas adrenales.

Varios estudios demuestran que la testosterona es el andrógeno que se produciría en mayor cantidad en el estroma post-menopáusico (4) (246).

También se producen pequeñas cantidades de androstendiona (137) (246) (60), pero el 80% de esta hormona se produce en la adrenal.

El estradiol de la post-menopáusica depende más de la transformación periférica de la estrona producida por la glándula adrenal (60) que del estroma ovárico (4).

La estrona es el mayor estrógeno circulante en la post-menopáusica depende predominantemente de la aromatización periférica de la androstendiona a partir de: tejido graso, hígado, riñón, cerebro y adrenal, su producción diaria es el doble que en la pre-menopáusica.

En algunas pacientes esta producción es suficiente para prevenir las manifestaciones clínicas de deprivación estrogénica y jugarían un papel principal en la génesis del carcinoma de endometrio.

Se ha demostrado (174) la actividad de la G-6-P-D (glucosa 6-fosfato-desidrogenasa), LD (lactodesidrogenasa) e ISO (isocitric-desidrogenasa), en el ovario, estas encimas son participantes en la estereoidogénesis. Se encuentra dicha actividad en la theca interna, en la granulosa, en células hiliares y también en el estroma (las células estromales que demuestran esta actividad encimática no son distinguibles en preparaciones rutinarias histológicas de las células vecinas estromales).

IV.2.7) CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS INTERSTICIALES

El concepto de células intersticiales es importante dado que su conocimiento podría contribuir al esclarecimiento de la fisiología y de la fisiopatología ovárica.

Dado que estas células intervienen en la producción y metabolismo de los andrógenos por los ovarios y que estos son precursores obligados de los estrógenos, y que el desequilibrio en la producción de andrógenos interviene en diferentes tipos de anormalidades reproductivas su conocimiento es de suma importancia.

Clasificación:

Se clasifican de acuerdo a su histología y a la posición en el ovario (78).

- a) Células intersticiales primarias (PI)
- b) Theca intersticial (TI)
- c) Células intersticiales secundarias (SI)
- d) Células hiliares intersticiales

Función:

Su principal función es la síntesis de esteroides los más importantes androstendiona y testosterona.

Ultraestructura:

Está en base a su función de producción hormonal (83).
Contienen retículo endoplásmico, mitocondrias, gotas lipídicas con colesterol y esteres primarios.

Origen:

Células mesenquimales del estroma ovárico con potencialidad para la proliferación y diferenciación.

Podrían ser identificadas estas células con las EASC (enzymatically active stromal cells) estudiadas por Scully (207).

a) CÉLULAS INTERSTICIALES PRIMARIAS

Se describe (78) su aparición en la médula a las 12 semanas de desarrollo, desapareciendo sobre las 20 semanas.

Tienen un aspecto muy similar a las células de Leydig testiculares, apareciendo yuxtapuestas a los cordones corticales que contienen oogonias y ovocitos (identificadas con el microscopio electrónico).

Función:

En un estudio (189) sobre el metabolismo realizado en cultivos de ovario fetal con pregnenolona sulfato obtienen: pregnenolona, 17 hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstendiona. No se obtienen ni progesterona ni testosterona ni estradiol.

Este estudio demuestra la capacidad de los ovarios fetales en pasar esteroides C21 a C19.

En el estudio de Paine(189) no pudo identificar la progesterona en ovarios fetales con lo cual parece haber evidencia de que la progesterona no es sintetizada en el ovario fetal y por tanto no puede ser utilizada como precursor de los C19 esteroides.

b) CÉLULAS INTERSTICIALES TECALES

Estas son las más importantes células intersticiales. Las células intersticiales tecales se encuentran en la theca interna de los folículos en desarrollo, producen andrógenos y sirven para destruir el folículo.

La theca interna aparece cuando el oocito está creciendo y la granulosa tiene de 2 a 3 capas.

Parece que a raíz de una señal dependiente del propio folículo (80) una serie de células estromales migrarían a la superficie del folículo, cuando las células estromales llegan a

la lámina basal se alinean paralelamente formando un anillo alrededor del folículo, tomando estas células un aspecto similar a los fibroblastos, al mismo tiempo se evidencian en esta zona 1 o 2 arteriolas llegando hasta la lámina basal.

Estas células estromales al llegar a las inmediaciones del folículo sufren un cambio apareciendo receptores LH y al menos una enzima que interviene en la biosíntesis de esteroides (3-beta-hidrosteroides-deshidrogenasa), según Magoflin 1982 (161).

Scully demuestra evidencia de actividad enzimática (6-G-P, Iso-D y LD) en células estromales, con actividad similar a células con papel conocido en la producción hormonal (theca, granulosa y células hiliares). Rice, obtiene androstendiona, testosterona y dehidroepiandrosterona en cultivos de tejido estromal. Paine en su trabajo con ovarios fetales donde no encuentran esta producción en la theca interna. Estos estudios podrían poner en discusión que la aparición de esta actividad enzimática fuera una característica de la transformación de células estromales a células intersticiales de la theca pues si se admiten los trabajos anteriores ya existirían estas actividades enzimáticas en las células estromales.

c) CÉLULAS INTERSTICIALES SECUNDARIAS (SI)

Se denominan así a las células de la teca interna hipertrofiadas que aparecen en el lugar de viejos folículos.

Estudios bioquímicos y citológicos indican que estas células mantienen sus características de células productoras de esteroides y de que continúan respondiendo a la LH (79).

Estas células intersticiales están inervadas, a diferencia de las TI ((181). Estudios en animales han demostrado terminaciones simpáticas adrenérgicas en estas células evidenciándose que tras el estímulo de estos nervios simpáticos se producen cambios ultraestructurales y bioquímicos en dichas células (41) (37) (4).

d) CÉLULAS HILIARES INTERSTICIALES

Estas células son idénticas ultraestructuralmente y funcionalmente a las células de Leydig.

Ha sido establecido que las células hiliares así como las de Leydig secretan testosterona en respuesta a la LH (226) .

No es mucha la información que se tiene sobre estas células a pesar de que pueden tener un papel fisiológico importante. Se las ha relacionado con fibras simpáticas.

Un dato a aclarar es la relación entre el aumento de inervación adrenérgica en las zona medular e hilar en el SOP y el papel funcional de las células hiliares en el SOP (213) .

IV. 3.

TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA

ANTICUERPOS MONOCLONALES

IV. 3. 1.

INTRODUCCION

La demostración por COONS y cols en 1942 (Ref. de 228), de antígenos neumococicos en tejidos con la ayuda de anticuerpos conjugados con marcadores fluorescentes , significó el punto de partida de las técnicas de inmunofluorescencia, cuya base no es más que la elevada selectividad y afinidad del anticuerpo específico, marcado con un colorante fluorescente, para el antígeno que promovió su formación.

A pesar de las enormes posibilidades de estudio que ofrecía esta técnica, su aplicación en histopatología se limitó a campos muy restringidos, en los que permitió profundizar en la interpretación de los procesos patológicos, corroborando la importancia de este método diagnóstico.

Uno de estos campos fue la patología glomerular renal, en el que demostrò que el estudio inmunohistoquímico era imprescindible para catalogar las lesiones glomerulares correctamente.

Sin embargo, estas técnicas no alcanzaron una extensa aplicación en Anatomía Patológica, debido a la imposibilidad de aplicarse en tejidos fijados e incluidos en parafina, necesitándose cortes realizados en congelación, en los que el detalle morfológico proporcionado es mucho menor que el obtenido en cortes en parafina.

Otro aspecto negativo de esta técnica que contribuyó a su falta de difusión, es que las preparaciones histológicas tenían que ser examinadas y fotografiadas rápidamente, pues la fluorescencia desaparece rápidamente.

Desde la introducción por Coons de los anticuerpos unidos a fijadores fluorescentes, los anticuerpos han sido utilizados no

solo para caracterizar antígenos tisulares sino también en el diagnóstico patológico (228).

En años más recientes el uso de anticuerpos unidos a ferritina o a enzimas ha permitido la identificación de numerosos antígenos a nivel tisular y ultraestructural (228) (233).

La sensibilidad de las técnicas inmunohistológicas ha sido amplificada por la conjugación de anticuerpos con haptenos, y más recientemente por el uso de las técnicas de avidina-biotina (21).

Casi todas las técnicas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico humano requieren el uso de anticuerpos desarrollados en otras especies (conejo, caballo, ratón, etc.) frente a antígenos humanos.

Los heteroantisueros han sido utilizados de forma extensa para la detección de inmunoglobulinas, factores del complemento, antígenos en inmunocomplejos en varios órganos (riñón, piel, pared vascular, etc.), para la localización de antígenos y péptidos (hormonas, enzimas) en las células y para la identificación de células, como subclases de linfocitos, en virtud de la caracterización de antígenos de superficie y citoplásmicos.

Estos estudios se encontraron con el problema de que en los antisueros utilizados se encontraban anticuerpos contra antígenos diferentes a los buscados.

El desarrollo reciente de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales por Köhler y Milstein 1975 (147) con buscados en la hibridación celular ha permitido obtener anticuerpos frente a un solo determinante antigénico.

Muchos de los anticuerpos monoclonales obtenidos, ha permitido obtener información inalcanzable por los métodos tradicionales, como por ejemplo, la tipificación de la familia celular de la serie linfocítica T.

Desde 1942 se van ha producir un serie de hechos, que van ha conducir a las técnicas de inmunohistoquímica al prominente grado de desarrollo que hoy han alcanzado :

- 1942 COONS, introduce la inmunofluorescencia, punto de partida.
- 1961 SINGER-SCHICH, marca los Ac con ferritina, para el estudio de estructuras antigénicas con microscopio electrónico.
- 1966 GRAHAM y KARNOVSKY, describen una técnica para revelar la peroxidasa de rábano absorbida en los túbulos renales proximales, en los ratones a los que se les inyectó por vía sanguínea.
- 1966 NAKANE y PIERCE por un lado y AVRAMEAS y URIEL, por otro marcan los anticuerpos con peroxidasa de rábano.
- 1969 MASON, introduce el método del "puente", Ig-enzima (PR).
- 1970 STERNBERGER, describe la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).
- 1972 MILSTEIN y KOHLER, Obtienen anticuerpos monoclonales, a partir de hibridomas.
- 1974 HEITZMANN y RICHARDS y
- 1977 HEGGENESS y ASH, localizan diversos componentes celulares, mediante técnicas basadas en la afinidad entre la Avidina y la Biotina.
- 1978 MASON, introduce la técnica de doble marcaje, lo cual permite demostrar en un mismo corte, dos componentes antigénicos diferentes.
- 1979 MASON y SAMMONS, describen el método del antígeno marcado.
- 1979 GUEDSON, TERNYNCK y AVRAMEAS, aportan dos técnicas inmunoenzimáticas, basadas en la afinidad avidina-biotina.
- 1981 HSU, RAINE y FANGER, Mejoran los métodos basados en la avidina biotina, introduciendo el complejo: Avidina-Biotina-Peroxidasa.

El desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de inmunohistoquímica va ha contribuir a introducir un profundo cambio en muchos campos del diagnóstico patológico.

IV. 3 .2 CAMPOS DE APLICACIÓN DE TÉCNICAS

INMUNOHISTOQUÍMICAS

Cada día se amplía más el número de anticuerpos específicos disponibles para identificar y localizar diferentes componentes biológicos en las células y tejidos, constituyendo potentes herramientas diagnósticas en los laboratorios de Anatomía Patológica, al permitir un estudio morfofuncional, que aporta una mayor objetividad a la problemática interpretativa establecida en muchos campos de la Anatomía Patológica.

Enumeramos a continuación los tipos de procesos, así como los componentes biológicos a identificar, a los que fácilmente podemos acceder de disponer del anticuerpo específico.

Procesos lipoproliferativos

- * Inmoglobulinas y sus fracciones
- * Lisozima
- * Antígenos de superficie celular
 - + Leucocitario común
 - + Células B

- + Células T
 - . Pan T
 - . T Helper
 - . T Supresoras
- + Células dendríticas
- + Ia (HLA- DR)
- + C3br

Neoplasias hormono-productoras

- * Sistema endocrino
 - + Hipófisis
 - + Tiroides/Células C
 - + Paratiroides
 - + Islotes de Langerhans
 - + Ovario/Testículo
 - + Trofoblasto
 - + Sistema APUD
 - + Neuropeptidos
- * Secreción ectópica hormonal

Neoplasias con expresión de antígenos asociados o específicos

- * Proteínas embarazo humano
 - + Específicas (trofoblasto) : LP, Sp-1
 - + Asociadas: α 2-PAG
 - + Fetales: α - Fetoproteína, CEA
- * Lactoferrina
- * Lisozima
- * α -1-antitripsina

- * α -1-antiquimotripsina
- * GCDFP (Gross Cystic Disease Fluid Protein)
- * Antígeno prostático específico
- * Fosfatasa Prostática específica
- * Citoesqueleto
 - + Actina/Miosina
 - + Tulubina
 - + Filamentos intermedios
 - . Desmina
 - . Vimentina
 - . Queratina
 - . GFAP (Glial fibrillary acidic protein)
 - . Neurofilamentos
- * Antígeno membrana epitalial humana
- * TPA (Antígeno polipeptídico tisular)
- * Fibronectina
- * Mioglobina
- * Grupos sanguíneos ABH
- * T-Ag (Thomsen-Friedenreich antigen)

Procesos en los que intervienen reacciones de hipersensibilidad

- * Inmunoglobinas y sus fracciones
- * Fibrinógeno
- * Complemento y sus fracciones
- * Albúmina

Procesos infecciosos

- * Bacterias
- * Hongos
- * Virus
 - + Herpes virus I y II
 - + Citomegalovirus
 - + Papiloma humano
 - + HBsAg
 - + HBcAg
- * Clamidias

La problemática planteada en el diagnóstico anatomopatológico, acerca de la naturaleza histogénica de una neoplasia, morfológicamente indiferenciada, especialmente si es metastásica, puede encontrar en las técnicas IHQ una ayuda excepcional, al permitir mediante una búsqueda sistemática, según un algoritmo definido, sino llegar a un diagnóstico concreto, si descartar toda una serie de posibles filiaciones, lo cual redundará, como mínimo, en una limitación de las exploraciones complejas a realizar en el portador del proceso neoplásico, en busca de foco primario.

IV. 3. 3. CONCEPTOS BÁSICOS DE INMUNOLOGÍA

Para poder comprender el porqué de las diferentes variantes de las técnicas de Inmunohistoquímica, así como el de los

sucesivos pasos a seguir, debemos tener presente algunos conceptos básicos de Inmunología.

Antígenos: Son aquellas sustancias químicas generalmente proteínas de elevado peso molecular, así como algunos polisacáridos, capaces de activar positiva o negativamente los linfocitos, por interacción con los lugares de combinación de los receptores de las células B o T. La activación positiva conduciría a una respuesta mediada por la producción de anticuerpos (Igs) y /o células T específicas. La activación negativa, condicionaría una falta de respuesta o tolerancia.

Generalmente, cada molécula antigénica posee varias zonas restringidas (6-7 aminoácidos), denominadas determinantes o EPITOPOS, que encajarían en el lugar de combinación de los receptores de las células B/T, o que interaccionarían con el correspondiente anticuerpo, determinando la especificidad de la reacción Ag- Ac.

Haptenos: Son sustancias químicas activas, de bajo peso molecular (400 daltons), incapaces , por sí solas, de inducir una respuesta inmune, pero que , combinados con moléculas transportadoras, adquieren capacidad inmunogénica, pudiéndose combinar con el anticuerpo, una vez producido éste.

Estos fundamentos se aplicarían, por ejemplo para la obtención de anticuerpos frente a hormonas esteroideas, las cuales, por sí solas, no son inmunogénicas. Sin embargo cuando se hallan unidas a una proteína, a través de un puente químico artificial, suscitan la formación de anticuerpos específicos.

Anticuerpos: Son productos elaborados por las células B, tras estimulación antigénica adecuada. Corresponden a las inmunoglobulinas (Igs), distinguiéndose cinco tipos principales, en base a diferencias en su composición y estructura: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

DENOMINACION	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
PESO MOLECULAR	150000	100000	900000	185000	200000
CONCENTRACIÓN	8-16	1,44	0,5-2	0-0,4	0,1-0,7
SUERO NORMAL	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
% DEL TOTAL DE INMUNOGLOBINAS	80	13	6	1	0,002

Las Inmoglobulinas son glicoproteínas constituidas por cuatro cadenas peptídicas, unidas entre sí por puentes transversales covalentes disulfuro (-S-S-). Contienen, además, hidratos de carbono en una porción que oscila entre el 3 y el 13 %.

De las cuatro cadenas peptídicas, dos corresponden que pesadas (446-567 aminoácidos, PM 50.000-70.000), distinguiéndose a su vez, cinco tipos: gamma, alfa, nu, delta y épsilon, mientras que las otras dos, denominadas ligeras (PM 25.000), son las cadenas: Kappa y landa, con 214 aminoácidos.

Cada inmunoglobulina tiene un solo tipo de cadena pesada (α , γ , ν , δ , ϵ) y otro de cadena ligera. Es decir, sea cual sea el tipo de cadena pesada, de una determinada inmunoglobulina, las cadenas ligeras serán o K o L. La relación K: L varía según el tipo de inmunoglobulinas y la especie animal. Así por ejemplo en el hombre la relación K: L sería 60 : 40, mientras que el ratón, sería de 95 : 5.

Tanto las cadenas pesadas como la ligeras, en sus porciones aminoterminales (NH₂), muestran una gran variabilidad en la secuencia y tipos de aminoácidos (Para la IgG= cadenas ligeras

107/108 aminoácidos y para las pesadas = 117), constituyendo las llamadas porciones variables o segmentos V, mientras que el resto de las cadenas peptídicas, tanto para las pesadas como para las ligeras, muestran una composición constante para cada tipo de Ig, denotándose porciones constantes o segmentos C.

Interacción Antígeno-Anticuerpo: La finalidad de combinación de los anticuerpos (Igs) con los antígenos, se asocia a las regiones Fab, por lo que cada molécula de Ig, tendrá dos puntos diferentes de unión con determinantes antigénicos, confiriendo la especificidad de unión las zonas variables de las cadenas ligeras (V l) y pesadas (V h).

A la interacción y unión del antígeno con el anticuerpo correspondiente, contribuyen diversas fuerzas, presentes en ambas moléculas: enlaces hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, fuerzas coulombicas y enlaces hidrófobos, siendo totalmente similares a las que unen un enzima con el sustrato, pero a diferencia de la interacción sustrato-enzima, la unión del antígeno con el anticuerpo no supone degradación de la molécula antigénica.

Anticuerpos policlonales: En las técnicas inmunohistoquímicas se utilizan, para la localización celular o tisular de antígenos o haptenos, anticuerpos desarrollados frente a diferentes determinantes antigénicos de un mismo antígeno, en un animal de diferente especie (heterólogo).

En inmunohistoquímica de tejidos y células humanas, utilizamos anticuerpos producidos por inmunización activa, con antígenos altamente purificados, en diferentes especies animales: conejo, cabra, cerdo, caballo, oveja, asno, ... En determinados casos, la fuente de obtención de anticuerpos es el suero humano, de personas inmunizadas frente a determinados antígenos, v. gr. bacterianos, víricos, etc. . . .

De dichos animales, se utiliza el suero total, o mejor, la fracción inmunoglobulínica, e incluso solamente el componente Ig específico. Podemos disponer de anticuerpos, constituidos,

tan sólo, por una parte de la molécula de Ig, tales como los correspondientes a los fragmentos Fab y F(ab')₂, que aventajan a la molécula completa de Ig, en que se elimina la posibilidad de unión específica e inespecífica de los anticuerpos, a través de la región Fc de las cadenas pesadas. Además, en el caso de los fragmentos Fab, disponemos de anticuerpos de bajo peso molecular y alta penetración.

IV. 3. 4. ANTICUERPOS MONOCLONALES

El desarrollo de la tecnología de la hibridación celular, por Köhler y Milstein (147), entre linfocitos y células de mieloma ha permitido la propagación de células híbridas que expresan:

- a) La capacidad de producción de anticuerpos derivada del linfocito
- b) El carácter de inmortalidad de la célula del mieloma.

El suero obtenido de animales debidamente inmunizados, contiene una gran variedad de anticuerpos específicos, no sólo frente a los posibles contaminantes que pueden acompañar al antígeno, sino también frente a los diversos epítomos propios de aquel y a pesar de ser purificados por procedimientos de precipitación, cromatográficos de elución o de inmunoabsorción, no consiguen alcanzar la homogeneidad de lugares específicos de unión con el antígeno, que caracteriza a los anticuerpos monoclonales.

Otro aspecto importante, a tener en cuenta, es que no se requiere una exhaustiva purificación del inmunógeno (por lo que corre menos riesgo de ser alterado), ya que, la selección del anticuerpo monoclonal tiene lugar a nivel celular, bloqueándose la aparición de anticuerpos, frente a contaminantes no deseables, o incluso, frente a determinantes antigénicos no requeridos del propio antígeno.

La producción de un anticuerpo monoclonal, se inicia con la inmunización de un animal adecuado (ratón, rata etc.) por un antígeno purificado o no, procediendo como si se tratara de obtener un anticuerpo policlonal. Cuando se detecta una tasa de anticuerpos elevada en el suero del ratón este se sacrifica, extrayéndose el bazo, en el cual se ubican numerosas células B, del cual se obtiene una suspensión rica en dichas células.

Se procede a fusionar las células B del bazo con células de mieloma de ratón deficientes en hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT) en presencia de polietilenglicol (PEG).

Las células de mieloma HGPRT-deficientes no se pueden multiplicar en presencia de aminopeptetina pues no pueden incorporar hipoxantina. Las células híbridas adquieren HGPRT de las células esplénicas y por tanto se puede multiplicar en medio HAT (hipoxantina-aminopeptetina-timina). Las células no fusionadas mueren y sólo las células híbridas viven.

Alcanzado el crecimiento definido de las células híbridas, hay que realizar la selección clonal de las diferentes células que elaboran los respectivos anticuerpos específicos, frente a los diversos epítomos del antígeno.

Una vez logrado este objetivo, se puede proceder de dos maneras:

a) Expandir el clono seleccionado, pudiendo recuperar el anticuerpo monoclonal del líquido sobrenadante.

b) Inyectar el clono elegido en la cavidad peritoneal del ratón y extraer el líquido ascítico, producido como consecuencia del crecimiento tumoral intraperitoneal, donde se hallará el anticuerpo monoclonal.

Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica, pueden obtenerse en forma de líquido ascítico, pudiéndose señalar como una desventaja el hecho de que, junto al anticuerpo específico monoclonal, se encuentran también otras inmunoglobulinas del ratón, así como diversas sustancias proteicas, que pueden interferir la especificidad de

estas técnicas al condicionar una tinción de fondo inespecífica. Este factor negativo lo obviaremos al utilizar la técnica de sobrenadantes pero como contrapartida la concentración en esta técnica de sobrenadantes, del anticuerpo es menor que en líquido ascítico (10 microg/ml en la técnica de sobrenadantes y 10 mg/ml en el líquido ascítico).

Los anticuerpos monoclonales, generalmente son del tipo IgG, pero en algunos casos pueden ser un subtipo de las IgG o bien IgM. Esto hay que tenerlo presente especialmente cuando se utilizan técnicas indirectas, pues el segundo anticuerpo, de no ser frente a las inmonoglobinas totales del ratón, debe ser "anti" del tipo particular Ig a que corresponde el primer anticuerpo.

Actualmente se están desarrollando hibridomas mixtos, linfocitos humanos-células mieloma de ratón e, incluso, hibridomas humano-humano, es decir, linfocitos humano-células mieloma humano (31, 115 dM).

La utilización de linfocitos humanos, en la producción de hibridomas, parece que va a representar un avance importante, al poder obtener anticuerpos monoclonales frente a antígenos tumorales específicos lo cual permitirá caracterizar más exactamente las neoplasias desde un punto de vista inmunohistoquímico.

Sinembargo la excesiva especificidad de los anticuerpos monoclonales frente a un determinado epítipo puede conducir a efectos contradictorios si este epítipo está presente en otras regiones diferentes a las consideradas.

IV. 3. 5. TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LA UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La multitud de compuestos químicos que constituyen el sustrato biológico de las diferentes estructuras celulares y tisulares, muestran una labilidad desigual frente a posibles acciones en el tratamiento de los tejidos, pudiendo estas acciones externas desnaturalizar o encubrir determinados antígenos.

Los tratamientos a los que hay que someter a las muestras tisulares pueden infringir importantes modificaciones en la configuración molecular de los antígenos lo que puede llevar en algunos casos incluso a la pérdida de la actividad antigénica.

Por tanto esta labilidad antigénica, se debe tener en consideración si se quieren realizar con éxito técnicas inmunohistoquímicas, por lo que habrá que obtener en cada caso las condiciones óptimas para el manejo y tratamiento de las muestras tisulares para preservar al máximo tanto la estructura tisular como las estructuras antigénicas.

Mientras que, en algunos casos podemos demostrar los antígenos, tras fijación e inclusión en parafina en otros deberemos recurrir a técnicas de congelación para poder obtener reactividad de los antígenos a estudiar.

Estudiaremos a continuación la técnica de procesamiento del tejido para técnicas de congelación.

IV. 3. 5. 1 PROCEDIMIENTOS PARA CONGELACIÓN DE TEJIDOS

Se han descrito diferentes procedimientos, con sus respectivas modificaciones, por lo que nos limitaremos a dar un esquema general, representado en el diagrama adjunto, comentando los aspectos peculiares de cada paso.

Con el fin de preservar los antígenos tisulares, al mismo tiempo que bloqueamos la acción de los diferentes sistemas enzimáticos debe realizarse de una forma muy rápida, para evitar la aparición de cristales de hielo en el seno del tejido que, por acción mecánica, destruirían su arquitectura. Al mismo tiempo, la congelación nos serviría de soporte, para la obtención de cortes histológicos.

La congelación puede realizarse de varias formas:

a) Congelación instantánea (Snap-frozen): El mejor procedimiento consiste en utilizar N₂ líquido, o bien, previamente recubierto de almidón; en isopentano (metil butano) enfriado con N₂ líquido; en hexano enfriado con una mezcla de metanol o acetona/CO₂.

b) Congelación con CO₂.

c) Las piezas pequeñas, antes de ser congeladas, se pueden colocar en PBS, OCT, o bien en gelatina disuelta en H₂O (12%).

De no procederse a seccionar inmediatamente los bloque tisulares congelados, éstos se pueden almacenar durante un largo período de tiempo en N₂ líquido, o bien, en el congelador a -70°C.

Para obviar la congelación instantánea, se pueden colocar las muestras tisulares en el medio de transporte descrito por MICHEL y cols., donde pueden permanecer entre 48 y 72 horas. Antes de ser congeladas en la platina del criomicrotomo, deben lavarse tres veces (20 minutos cada vez) en tampón citrato 0,025M pH 7,0. Se ha señalado que, incluso este tratamiento, puede incrementar la reactividad antigénica.

Las piezas tisulares congeladas son cortadas en el criomicrotomo, obteniéndose cortes de 5-8mm de espesor, los cuales son fijados a portaobjetos recubiertos de una sustancia adhesiva (Gelatina-Alumbre de Cr.), procediéndose a desecar el corte a temperatura ambiente 2-24h. en la nevera = 16h., o mejor, en la cámara de un congelador-desecadro 4-18h. Este proceso de deshidratación prolongada, aparte de no alterar prácticamente la reactividad antigénica, favorecería la preservación de la morfología tisular.

Tras deshidratación de los cortes, éstos son fijados en acetona, a temperatura ambiente, durante 10 minutos para, posteriormente, desecarlos de nuevo. En este momento, ya están listos para la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas. De no realizarse inmediatamente éstas últimas, deberemos proceder a conservarlos a -20°C , no sin antes envolver, individualmente, cada preparación con hoja de aluminio, hasta cuando se quieran procesar, en cuyo momento, se sacarán del congelador, no siendo desprovistos de la envoltura de hoja de aluminio, hasta que hayan alcanzado la temperatura ambiente. En este momento, ya se puede aplicar el anticuerpo específico, no siendo imprescindible hidratar previamente los cortes con PBS, pH 7,5.

IV. 3. 5. 2. EL PROCESO DE FIJACIÓN PREVIA A LA APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS IHQ

Para conservar la morfología tisular y celular, procedemos a fijar los tejidos con fijadores adecuados. Pero este proceso de fijación, que nos va a preservar, más o menos, la estructura, al mismo tiempo, puede producir modificaciones en los componentes antigénicos, de mayor o menor importancia, que, necesariamente, repercutirán en diverso grado en el éxito de su identificación y localización. Por ello, el fijador ideal para inmunohistoquímica, debería reunir las siguientes características:

- a) Preservar la integridad de los antígenos.
- b) Preservar, adecuadamente, la morfología celular y tisular.
- c) Impedir la extracción, difusión o desplazamiento del antígeno, durante la fijación o posteriormente.
- d) No debe interferir la reacción antígeno-anticuerpo.
- e) Ser de uso habitual en los laboratorios de Anatomía Patológica, para poder ampliar el campo de aplicación de las técnicas IHQ a un extenso espectro de tejidos y procesos patológicos.

No existe un fijador universal, por lo que el fijador que elijamos en cada caso, deberá estar en función de los grupos reactivos antigénicos que pretendemos demostrar, tratando de buscar un equilibrio entre preservación de la morfología y de la inmunoreactividad.

Básicamente, distinguimos dos tipos de fijadores:

a) Los que actúan por precipitación (etanol, metanol, acetona,...) los cuales ejercen una escasa acción desnaturalizadora sobre los antígenos, la cual es reversible en su mayor parte. Sin embargo, la preservación de la morfología es deficiente, y la inmovilización de los antígenos, no se halla garantizada.

b) Los que actúan estableciendo uniones cruzadas (Aldehídos: formol y glutaraldehído; Carbodiimida,...). Su acción desnaturalizadora sobre los antígenos es mayor. Por el contrario, la conservación de la morfología y la inmovilización de los componentes protéicos, es efectiva.

Aparte del tipo de fijador seleccionado, existen otros factores, directamente relacionados con el proceso de la fijación que influyen decisivamente en la demostración de grupos antigénicos.

Especialmente, deberemos tener presente:

a) Fijación inmediata de la muestra tisular, si se trata de antígenos que, fácilmente, difunden. Tratamiento similar deberemos realizar para evitar la captación pasiva de proteínas del líquido intersticial, por parte de las células.

b) La temperatura de fijación, generalmente, es la ambiental (20-22°C), pero en determinados casos, deberemos realizarla a 0-4°C.

c) El tiempo de actuación del fijador es, también, un factor importante a considerar. Si se prolonga excesivamente, cabe el riesgo de disminuir la reactividad antigénica. A modo orientativo, podemos señalar que los fijadores, tales como el formol, paraformaldehído glutaraldehído o Bouin, no deben prolongarse más allá de las 24 horas, siendo tiempos adecuados

los no superiores a 6-12 h. Para aquellos constituidos a base de cloruro de mercurio II, el tiempo máximo de actuación se debe limitar a 4-6 h.

Entre los fijadores utilizados más habitualmente en IHQ, podemos señalar los siguientes, insistiendo que, en cada caso en particular, deberemos elegir el más apropiado, que preserve todas las relaciones especiales de los constituyentes celulares, sin afectar la unión específica de los anticuerpos con los antígenos tisulares.

- a) Formol 4% salino-ac. acético 2%; Formol 3,5%-Glutaral-dehído 1%.
- b) Formol-Cloruro de Hg II; Susa; Ps.
- c) Bouin; Dubosq-Brasil; Zamboni.
- d) Periodato-Lisina-Paraformaldehído (PLP).
- e) Carbodiimidas hidrololubles:
 - 1 Etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-HCL, 1-2% en PBS.
 - p-benzoquinona.
 - Carbodiimida + 0,3% glutaraldehído.
- f) Etanol; Metanol; Acetona; Carnoy.
- g) Acetona-Formol tamponado.
- h) Formol; Metanol; Acetona.

IV. 3 . 5. 3. EL PROCESO DE INCLUSIÓN

La obtención de cortes para observación microscópica requiera, en determinados casos, la inclusión de la muestra tisular en un material que le dé consistencia y facilite su sección. Sin embargo, las diferentes fases de dicho proceso, en mayor o menor grado, conllevan una alteración del tejido afectando, especialmente, a componentes lábiles, como pueden ser enzimas o grupos antigénicos. Es por ello, por lo que debemos ser muy cuidadosos en el proceso de inclusión, eligiendo el material más adecuado, si queremos preservar ampliamente la reactividad antigénica.

Analizaremos los tres tipos de inclusión que, básicamente, utilizamos:

a) Inclusión para cortes en congelación: Para obtener cortes en congelación, no se requiere, habitualmente, incluir los tejidos, basta rodearlos con agua, OCT, ... etc. Pero en casos muy particulares (cilindros de médula ósea), y debido al tipo peculiar de muestra, debemos, antes de congelar en N₂ líquido el tejido, infiltrarlo con diversos medios, como pueden ser:

- Gelatina 10-20%.
- Goma acacia-Sacarosa.
- Gel de poliacrilamida.

b) Inclusión en parafina: Constituye el procedimiento rutinario, pero si queremos obtener buenos resultados, hay que controlar los diferentes pasos:

- **Deshidratación:** Para minimizar la posible alteración de los componentes antigénicos se ha recomendado, especialmente en el caso de inclusión en sustancias plásticas, la aplicación de productos que preservarían la reactividad antigénica:

- a) PVP (PM 10.000) al 5% añadida al deshidratante.
- b) Acetimidato-HCL (EAI), 0,2M en 0,2M K₂HPO₄ a pH 7,3 durante 2 horas, antes de la deshidratación. La deshidratación brusca y no progresiva, favorecería la preservación de antígenos proteicos.

- **Aclaramiento:** Se recomienda: Xilol, Cloroformo, Inhibisol.

- **Infiltración en parafina:** La temperatura de las parafinas no debe sobrepasar los 60°C, ya que la reactividad antigénica se vería seriamente dañada.

La utilización de mezclas de parafina-sustancias plásticas, de uso común, no serían recomendadas para las técnicas IHQ, pues, a pesar de la desparafinación, podrían quedar muestras de plástico que aumentarían la tinción de fondo. De utilizar este tipo de parafinas, se recomienda una desparafinación exhaustiva, cambiando muy frecuentemente los

xiloles. Otra posibilidad sería incluir en parafina normal y, el bloque, hacerlo con parafina-plástica.

- El baño de flotación de los cortes, así como la fijación de éstos a los portaobjetos, deben mantenerse a temperatura no superior a los 37°C.

c) Inclusión en sustancias plásticas: La necesidad de demostrar al M/E componentes antigénicos, mediante técnicas de IHQ, hizo que se investigasen diversos procedimientos de inclusión en sustancias plásticas, así como de tratamiento de dichos cortes, con el fin de que la identificación ultraestructural de grupos antigénicos, fuese una realidad.

La posibilidad de obtener cortes semifinos extensos (15x10mm) de tejidos incluidos en plástico, para observación al M/O, supone la aplicación a este tipo de secciones de las técnicas de IHQ desarrolladas para M/E, y que podemos reducir a dos grupos fundamentales:

- Técnicas IHQ previas a la inclusión: En este caso, el tejido embebido en agar al 7%, es seccionado en cortes de 40-200mm, con ayuda de un microtomo. A estas secciones gruesas se les aplica la técnica IHQ y, posteriormente, se incluyen en resina plástica. Para facilitar la penetración de los anticuerpos, así como de diferentes reactivos, se puede utilizar detergentes tipo Tritón X 100 (0.4-0.2%).

Este procedimiento puede usarse para cortes semifinos en M/O, no sólo con técnicas inmunoenzimáticas, sino, incluso, con anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes, v.gr., para el estudio de la inmunopatología glomerular renal.

- Técnicas IHQ postinclusión: La reactividad antigénica se puede demostrar tras la inclusión en determinadas sustancias plásticas, entre las que cabe destacar:

1. 2 Hidroxietil-metacrilato (HEMA).
2. Resinas Epoxi no polares: Epon 812.

3. Resinas Acrilato-Metacrilato polares: Lowicryl K4M. Este último tipo de resinas, tiende a imponerse en las técnicas IHQ postinclusión, debido a que la deshidratación inclusión y

polimerización (luz ultravioleta 360 nm), puede realizarse a baja temperatura 0°C a -50°C, lo cual minimiza los fenómenos de desnaturalización inherentes a tales procesos.

Los cortes semifinos (1,5 Mm), requieren un tratamiento adecuado, encaminado a permeabilizar o disolver la resina, que será descrito más adelante, antes de aplicarles el anticuerpo primario específico.

IV. 3 .5. 4. DESENMASCARAMIENTO DE GRUPOS ANTIGÉNICOS

El proceso de fijación de las muestras tisulares, especialmente con fijadores de tipo aldehído, conduce al establecimiento de puentes de unión cruzados entre los componentes proteicos, por lo que algunos antígenos de naturaleza protéica, podrían quedar ocultos e inaccesibles a los anticuerpos específicos. Para devolver la reactividad antigénica eclipsada por los fijadores aldehídos, se han descrito diferentes procedimientos:

a) Tratamiento con enzimas proteolíticas.

Los más utilizados son:

- Tripsina 0,1% + CaCl_2 0,1% a pH 7,8 ajustado con NaOH 0,1%, o bien, en PBS O TBS. Se deja actuar entre 20 y 60 minutos a 37°.
- Proteasa I 0,1% en 0,05M Tris-HCL a pH 7,6 durante 60 minutos a 37°C.
- Proteasa V 0,1% en PBS pH 7,4-7,6 a 22° durante 15 min.
- Proteasa VII 0,05% en 0,05M Tris-HCL a pH 7,6 a 37° durante 10 min.
- Pepsina 0,4% en HCL 0,01N a pH 2,0 a 37°C durante 30-60 min.

El mecanismo de acción podría responder a una de estas posibilidades:

- Facilitando la penetración de los anticuerpos en el seno del tejido, pudiendo acceder más fácilmente a los grupos antigénicos.

- Eliminando la trama de materiales proteicos que, por efecto del proceso de fijación envuelven a los grupos antigénicos.

- La persistencia de máximas muestras de enzima utilizado, a pesar de lavados repetidos, podría introducir modificaciones en la molécula del anticuerpo, fragmentándola en partes más pequeñas, con un mayor grado de penetración tisular.

El tiempo de tratamiento varía, según el tipo de enzima utilizado y la duración de la fijación. En general, podemos decir que cuanto mayor es el tiempo de fijación, la actuación del enzima debe prolongarse más.

Sin embargo, en cada caso en particular, debemos hacer una serie de ensayos, variando la concentración del enzima y el tiempo de actuación, seleccionando aquellos que proporcionan mayor contraste de localización del antígeno con menor tinción inespecífica de fondo.

El tratamiento proteolítico, puede utilizarse, no sólomente para tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, sino que, también, se muestra útil para cortes en congelación de tejidos, sometidos a un proceso de fijación similar.

b) Tratamiento con una solución de Sacarosa hipertónica.

Se aplica a los cortes, una solución de sacarosa 10% en PBS, durante 1-20 horas.

c) Tratamiento con una solución de Urea.

La aplicación de una solución de Urea 3M, durante 5 min. a temperatura ambiente, promovería la reversibilidad de las alteraciones introducidas en el antígeno por el fijador. Es especialmente útil, este tratamiento, tras fijación en formol-Sublimado.

Las preparaciones son sometidas a estos tratamientos antes de que se apliquen aquellos procedimientos encaminados a disminuir o suprimir la tinción de fondo.

d) Fijación con ácido acético.

Si en el proceso de fijación, se ha utilizado una solución que contenga ácido acético, no es necesario realizar el tratamiento enzimático.

Incluso en el caso de que el fijador no contenga ac. acético, podemos realizar una postfijación en AF (Ac. acético 5% + Formol 10%), obteniéndose resultados similares y no requiriéndose tratamiento proteolítico.

Si a los múltiples pasos a que hay que someter un corte tisular en las técnicas IHQ, antes de poder ser observado al microscópio, añadimos tratamientos complementarios, como puede ser la digestión parcial enzimática, corremos el gran riesgo de que se nos desprenda la sección del portaobjetos. Para evitar esta catástrofe, debemos adherir los cortes con adhesivos especiales:

- Gelatina-Alumbre de Cr.: Para dificultar la actuación del enzima sobre la gelatina, sumergimos las preparaciones en formol al 10%, durante 30 min., para endurecer la gelatina.

- Acetato de polivinilo diluido en H₂O 1:20.

- Poli-L-Lisina (PM 350.000). Solución acuosa 0,05-0,1%.

La acción beneficiosa del ac. acético, en la identificación de grupos antigénicos, nos proporciona la posibilidad de decalcificar pequeñas muestras, como puede ser cilindros óseos. Para ello, podemos utilizar Ac. acético o Ac. fórmico al 10%, hasta un máximo de cinco días, sin afectar negativamente la reactividad antigénica.

IV. 3. 6.

PROCEDIMIENTOS TÉCNICOSINMUNOHISTOQUÍMICOS BÁSICOS

En todas las técnicas IHQ, el paso fundamental, consiste en la exposición del antígeno, a identificar y localizar, frente a un anticuerpo, para constituirse un enlace altamente selectivo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac).

Para detectar el lugar de depósito del anticuerpo (Ig), con lo que podremos conocer la ubicación real de una determinada sustancia en el seno de un tejido, debemos "marcar" con algún producto visible, directamente o bien indirectamente, tras su actuación sobre un determinado sustrato, al microscopio óptico o electrónico.

Existen varios grupos fundamentales de marcadores: -) Fluorocromos, -) Enzimas, -) Metales electrodensos, -) Productos radioactivos y -) Virus, condicionando, cada uno de ellos, unas peculiares técnicas especiales.

El proceso de unión de tipo químico de los diferentes marcadores o de otros productos, como puede ser la biotina o un hapteno, a la molécula del anticuerpo, se denomina conjugación. Dicho proceso, debe controlarse escrupulosamente, para impedir que el anticuerpo sea alterado, con lo que podría disminuir la sensibilidad y especificidad de aquel. Por eso, siempre debemos usar conjugados que nos ofrezcan la máxima garantía.

Con el fin de evitar este posible aspecto desfavorable de la conjugación, en algunas técnicas se utilizan complejos solubles de:

Antígeno (marcador: peroxidasa, glucosa oxidasa) -----
Anticuerpo (Igs)

Así, se han obtenido diversos complejos, tales como el PAP (Peroxidasa-Antiperoxidas), el GAG (Glucosa oxidasa-Antiglucosa oxidasa), que aportan una gran sensibilidad a las técnicas IHQ.

En algunos casos, los complejos se establecen entre componentes que no corresponden a Igs, sino a moléculas que tienen una gran afinidad entre sí, como puede ser la Avidina y la Biotina. De este modo, se constituye el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC).

IV. 3. 6. 1 . MÉTODOS DIRECTOS:

Son los procedimientos más sencillos, de un solo paso. Es decir, tan sólo aplicamos el anticuerpo específico frente al antígeno que deseamos demostrar. Dicho anticuerpo se halla conjugado con el marcador, el cual, directamente (fluorocromos o metales electrodensos) o tras una serie de reacciones histoquímicas, se hace "visible" al microscopio.

Una variante al método directo clásico, sería la denominada técnica del anticuerpo híbrido. En ella se utiliza un anticuerpo híbrido (partiendo de dos anticuerpos específicos, que han sido escindidos enzimáticamente y, posteriormente, son reconstituídos) $F(ab')_2$, que representa una doble especificidad. Una de las regiones Fab' , se uniría al antígeno, mientras que la otra lo haría con un marcador determinado, peroxidasa, ferritina, ... etc.

Como ventaja del método directo, respecto a los indirectos, podríamos señalar que, la aplicación de una sola incubación con anticuerpo, reduce la posibilidad de aparición de uniones inespecíficas, al mismo tiempo que representa una técnica de rápida ejecución. La desventaja sería que utiliza anticuerpos conjugados con marcadores, lo cual, como ya hemos dicho antes, puede suponer una alteración de la molécula de Ig, pudiéndose ver afectadas su afinidad o especificidad. Otro aspecto negativo es la necesidad de tener tantos anticuerpos marcados, como antígenos queramos demostrar.

IV. 3. 6. 2. MÉTODOS INDIRECTOS:

En ellos, el primer anticuerpo utilizado, que es específico para el antígeno que pretendemos demostrar, no se halla conjugado con el marcador (aunque en algunas variantes de estos métodos se halla conjugado con diversas sustancias, con el fin de poder prolongar la cadena de enlaces específicos entre el antígeno y el marcador), por lo que debemos utilizar un segundo anticuerpo (Ig), desarrollado en un animal de diferente especie que el primero (heterólogo), frente al primer anticuerpo (Ig).

Este segundo anticuerpo, puede estar marcado o no. En este último caso, se prolonga la cadena, utilizando un nuevo anticuerpo, desarrollado en la misma especie animal que el primero, el cual nos permitirá alcanzar el último eslabón, es decir, el marcador.

Estos métodos aventajan a los directos en que son más sensibles, pero la aplicación de diferentes anticuerpos (dos, tres o, incluso, cuatro) en una misma técnica, aumentan el riesgo de uniones inespecíficas y, además, son, por número de pasos, más laboriosos; al mismo tiempo, no se requiere disponer marcados los anticuerpos primarios.

Dentro de los procedimientos indirectos, y partiendo de la forma más simple (dos capas de anticuerpos), se han descrito diversas variantes, que enumeraremos a continuación, teniendo presente que, cada uno de ellos, tiene sus ventajas y sus inconvenientes, por lo que deberemos elegir, en cada caso, el procedimiento más idóneo.

a) Técnicas indirectas, en las que la cadena de pasos (capas) se establece por uniones específicas Ag-Ac.

- Método indirecto de dos capas.

En este caso, el segundo anticuerpo anti Ig del animal, en que se desarrolló el primero, se halla marcado, por lo que, con disponer de un solo anticuerpo marcado,

podemos demostrar múltiples antígenos, siempre y cuando, el primer anticuerpo sea de la misma especie animal.

- Métodos indirectos con Ig puente.

Se utilizan tres anticuerpos. El segundo actúa a manera de "puente", uniendo el primero y el tercero, por lo que, como ya hemos señalado, éstos dos últimos deben ser de la misma especie animal.

Otro hecho importante, a tener en cuenta, es que el puente debe ser utilizado a diluciones bajas (generalmente 1:20-1:40), es decir, en exceso respecto al primer anticuerpo, para evitar que ambas regiones Fab del anticuerpo puente, se unan al primer anticuerpo, consiguiendo que una de las regiones Fab quede libre, para unirse con el tercer anticuerpo.

- Método indirecto con puente-Ig no marcada-enzima.

El tercer anticuerpo es una Ig antiperoxidasa de rábano, que une el anticuerpo puente con la PR. Esta última, se aplica tras la actuación de aquel, por lo que es un método de cuatro pasos, lo cual le hace largo y laborioso, pero da una escasa tinción de fondo.

- Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

Se unifican los dos últimos pasos señalados en la técnica anterior (3º anticuerpo y PR), utilizando el complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), lo cual reduce el número de pasos a tres.

- Método del doble puente.

Sería una variante del método PAP. Una vez completados los pasos hasta la incubación, con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa, se vuelve a aplicar Ig puente en exceso y, de nuevo, complejo peroxidasa-antiperoxidasa. El revelado de la peroxidasa, se realiza con DAB a pH 5,5-6,0.

Mediante este método, conseguimos una amplificación de la visualización de pequeñas cantidades de antígeno que, de otro modo, serían difíciles de demostrar.

- **Método indirecto del antígeno marcado.**

Utiliza un segundo anticuerpo antiperoxidasa, conjugado con el antígeno a demostrar. El anticuerpo primero se uniría, por un lado, al antígeno tisular y, por el otro, al antígeno conjugado con el segundo anti- cuerpo.

- **Métodos del hapteno conjugado con anticuerpos.**

Se recurre en este proceder al empleo de haptenos conjugados con anticuerpos.

Podemos utilizar una técnica de dos pasos, con un hapteno conjugado al primer anticuerpo y un segundo anticuerpo antihapteno marcado, o bien, de tres capas, utilizando un segundo anticuerpo antihapteno, que actúa de puente entre el primero y la PR o el PAP conjugados con el hapteno.

b) Técnicas indirectas, en las que la cadena de pasos (capas), se establece por uniones altamente específicas, distintas de la Ag-Ac, o bien, participan ambos tipos.

- **Métodos de la Avidina-Biotina.**

Basados en la alta especificidad de la unión Avidina-Biotina, utilizan el complejo Avidina-Biotina-PR (ABC), en vez del PAP junto con un primer anticuerpo (2 capas), o bien, el segundo anticuerpo biotinado (3 capas).

- **Métodos de la Proteína A.**

Se fundamentan en la unión específica de la proteína A con la región Fc de la IgG humana y de otras especies animales. Podemos aplicar una técnica en dos pasos, utilizando la Proteína A, marcada con fluorocromos o enzimas, o bien, en tres pasos, actuando, en este caso, la Proteína A como puente de unión entre las regiones Fc del anticuerpo primero y del complejo PAP.

También puede usarse Proteína A-Biotina y el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, en una técnica, también, de tres pasos.

IV. 3. 7. TÉCNICA DE LA INMUNOPEROXIDASA

Son múltiples las técnicas descritas en inmunohistoquímica (Técnicas inmunoenzimáticas, de inmunofluorescencia, de la avidina -Biotina, basadas en la proteína A etc.).

En el presente estudio se ha utilizado una técnica inmunoenzimática, la de la inmonoperoxidasa.

La peroxidasa es la enzima más utilizada en técnicas IHQ enzimáticas, aunque también se han utilizado otras con buenos resultados como : Glucosa oxidasa, Fosfatasa alcalina y B-Galactosidasa.

Estas otras enzimas han tenido menos difusión en su uso por dos razones:

- Los precipitados obtenidos eran solubles, generalmente, en Alcohol-Xilol, por lo que no se podían montar las preparaciones con DPX.
- El método para su utilización es muy laborioso.

Aunque posteriormente se han desarrollado técnicas para subsanar los dos inconvenientes descritos sigue siendo el método de la inmunoperoxidasa, el método inmunoenzimático más utilizado.

Con la introducción de las técnicas inmunoenzimáticas en la década de los sesenta se consiguió un gran auge de las técnicas de inmunohistoquímica (21).

Se introdujeron enzimas como marcadores de la unión antígeno-anticuerpo, estos enzimas actuando sobre un sustrato definido conducen a la formación de un sustrato coloreado, visible con el microscopio óptico.

El uso de estas técnicas supuso un gran avance, al poder utilizar tejidos fijados e incluidos en parafina, lo que hizo posible realizar estudios retrospectivos, no precisar de el examen inmediato de la preparación, como en la IF, y guardar indefinidamente las preparaciones.

Criterios para selección de la enzima ideal en técnica inmunoenzimáticas (188):

- Fácil obtención.
- Reacción histoquímica, para su detección simple.
- No producir alteraciones importante en la Ig, en la conjugación con esta.
- Debe ser estable a pH neutro, lo mismo que sus conjugados.
- El tamaño de la molécula debe ser lo más pequeño posible.
- A poder ser, no debe hallarse en el tejido en estudio.

El enzima que más se ajustaba a los criterios antes citados, era la Peroxidasa de rábano (PR), el cual se ha erigido en el marcador más utilizado.

Pasaremos a describir la técnica con la inmuno peroxidasa.

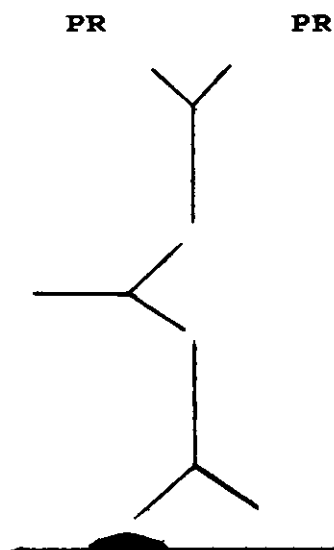
Caben dos posibilidades para introducir la PR dentro de la cadena de componentes, que integran la técnica IGQ:

- Unión covalente de la PR a un anticuerpo (Ig); Conjugado Ig-PR.
- Unión de tipo inmunológico (Ag-Ac), en la que la PR actuaría como antígeno.

La unión covalente de la PR con el antígeno, supone la introducción de alguna modificación en la molécula de Ig, lo cual puede afectar a su especificidad y afinidad, a pesar de que, hoy en día, las técnicas de conjugación, minimizan dichos aspectos nefastos.

Estas circunstancias son las que hacen que los métodos directos, usando conjugados de Ig-PR, sean poco rentables, mientras que, los indirectos, de dos pasos, utilizando un segundo anticuerpo conjugado con PR, frente a la Ig que constituye el primer anticuerpo, son utilizados en algunos casos, que más adelante describiremos.

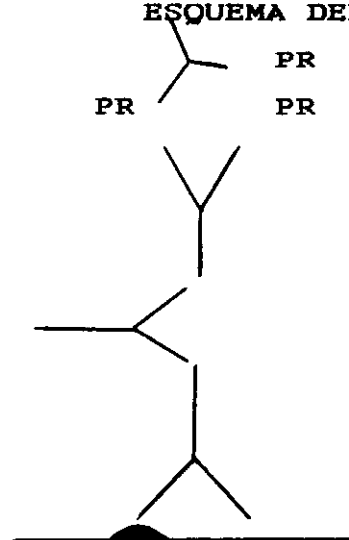
Para evitar estos efectos negativos de la conjugación, se introducen los métodos en los que, la unión de la PR con la Ig, va a ser de tipo inmunológico. Así, surge el método denominado "Del puente con Igg no marcada y Enzima", que esquemáticamente se estructuraría así:



- IV Peroxidasa de rábano. (0,005 mgr/ml).
 III Anticuerpo 3º, anti PR desarrollado en animal A (Dil. 1:200).
 II Anticuerpo 2º, "puente" anti Ig animal A, desarrollado en otra especie animal B (En exceso, diluido 1:25).
 I Anticuerpo 1º específico, frente al antígeno, y desarrollado en animal especie A (Dil. 1:500)
ANTÍGENO.

Este procedimiento, da muy buenos resultados, con una tinción de fondo mínima, pero es muy laborioso. Para obviar este hecho, los dos últimos pasos III y IV, se han unificado, gracias a la obtención de complejos de Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP) solubles, con los que el número de pasos se reducen a tres, acortándose sensiblemente la duración del proceso y, así, llegamos al llamado método PAP, hoy en día, de utilización muy difundida. El complejo PAP, se halla constituido por dos moléculas de Ig y tres de PR.

ESQUEMA DEL COMPLEJO PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA (PAP)



- III PeroxidasaAntiperoxidasa(PAP).
 Desarrollado en animal esp. A (D. 1:50- 1:200)
 II Anticuerpo 2º, "puente", anti Ig animal especie A, desarrollado en otra especie animal B. (En exceso, dilución 1:20-1:40).
 I Anticuerpo 1º específico, frente al antígeno, desarrollado en animal especie A. (Dil. a determinar).
ANTÍGENO.

Nota : esquema tomado de (188)

En este método, el complejo PAP debe desarrollarse por inmunización de animales de la misma especie que los utilizados para obtener el anticuerpo 1º específico para un determinado antígeno. Generalmente, son de conejo o de cabra, por lo que deberán usarse respectivamente PAP de conejo o PAP de cabra. Esto suponía una cierta limitación a este método, especialmente tras la progresiva utilización de anticuerpos monoclonales producidos en ratón, ya que, en este caso, tendríamos que introducir un paso intermedio. Es decir, tras aplicar el anticuerpo monoclonal de ratón, incubaríamos el corte con un anticuerpo de conejo o de cabra anti Igs de ratón, y ya podríamos continuar con el desarrollo de los sucesivos pasos del método PAP. Esta contrariedad, hoy en día, se halla subsanada, dado que podemos disponer de PAP, F (ab') 2-PAP y Fab-PAP de ratón.

Para que la aplicación de la técnica PAP, a los cortes histológicos, sea eficiente, deberemos someter éstos a una serie de tratamientos complementarios, algunos de los cuales son, también, utilizables en otros métodos IHQ.

- Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena.

Deberemos tener presente que, algunas estructuras tisulares, como pueden ser los hematíes, granulocitos, macrófagos,... muestran actividad peroxidásica, por lo que debemos hacer un tratamiento previo de los cortes, para bloquear la actividad peroxidásica endógena, siempre y cuando, utilicemos la PR como marcador. Para ello se han propuesto diversos procedimientos:

- a. Alcohol metílico 100% + 0,3-3% H₂O₂ 30 min.
- b. H₂O dest. + 3% H₂O₂ 30 min.
- c. HCl 0,074% (0,2 ml HCl conc./100 ml metanol abs) . . 30 min.
- d. Fenilhidrazina 0,1% pH 7,0 a 37° C 30 min.
- e. Nitroferricianuro Na1%+1% Ac.acético en metanol abs 15 min.
- f. Ac. Peryódico-Borohidruro
 - 1º) Ac. Peryódico (0,1M), 2,28% 5 min.
 - 2º) K o Na borohidruro 0,02% 2 min.

- Supresión de la tinción inespecífica de fondo.

La tinción inespecífica de fondo, que dificulta y ensombrece, en casos extremos, una correcta delimitación de las áreas realmente positivas, obedece a diversas causas:

a. Difusión extracelular de los antígenos por fijación defectuosa.

b. Persistencia de medio de inclusión, especialmente si se utilizan parafinas conteniendo sustancias plásticas.

c. Incubación con anticuerpos, conteniendo, además del específico, otros frente a diferentes antígenos.

d. Absorción inespecífica de los anticuerpos a los tejidos. La agregación del anticuerpo, formando polímeros, aumenta dicha absorción inespecífica.

Los tejidos con alto contenido en grupos ácidos, placenta, tejidos necróticos, ... muestran una importante afinidad inespecífica para las Igs.

e. Unión de los anticuerpos (Igs), a través del complemento (Clq) , o de la región Fc.

Los procedimientos para minimizar estos hechos, y que pueden aplicarse a otras técnicas del IHQ, se resumen en:

a. Rápida fijación, utilizando el fijador más adecuado.

b. Desparafinar exhaustivamente. Colocar las preparaciones en la estufa, a 58-60°C, para que se funda la parafina que impregna los tejidos. Renovar los baños de xilol, frecuentemente.

c. Absorber el antisuero con homogeneizados tisulares, en los que no existe el antígeno que tratamos de demostrar.

d. Utilizar diluciones altas del anticuerpo específico. Eliminar los agregados de Igs mediante filtración.

e. Incubación previa de las secciones con suero normal (SN) de animal no inmunizado, a una concentración del 5-20%. Se recomienda que corresponda a la misma especie animal en que se obtiene el anticuerpo puente.

También se puede añadir, al suero normal, seralbúmina bovina (SAB) u ovoalbúmina al 1%.

Podemos aplicar un segundo tratamiento con SN, inmediatamente después del anticuerpo específico primero.

f. Aplicación de anticuerpos, carentes de complemento, y de fragmentos $F(ab')_2$ y Fab, carentes de la región F_c de las Igs, en vez de la molécula completa.

- Dilución de los anticuerpos.

La dilución de los diferentes anticuerpos, así como del complejo PAP, se realiza en PBS 0,01M o en TBS 0,05M a pH 7,2-7,6, a los que se les adiciona SN (de la misma especie animal que el puente) el 5% y SAB 1%, con el fin de bloquear las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Para facilitar la penetración de los anticuerpos, en el seno del tejido, puede añadirse un detergente tipo Tritón X-100 o Twen 20 a una concentración de 0,05-0,5%. Generalmente, los anticuerpos contienen, como conservantes, Ácido Sódico (N_3Na) 0,05-0,1%, o bien Tiomerosal (Merthiolato) 0,01%. Si se añaden en las diluciones, debemos tener en cuenta que, la ácido sódico, inhibe la peroxidasa, por lo que, en la dilución del PAP, hay que suprimir.a, o bien, usar el Thiomersal.

La dilución óptima de los anticuerpos primarios, hay que realizarla, por tanto, utilizando siempre la dilución más alta posible, con la que consigamos mayor contraste entre zonas positivas específicas y el fondo.

La dilución del anticuerpo puente, así como del complejo PAP, debemos hacerla una en función de la otra, siguiendo el esquema adjunto:

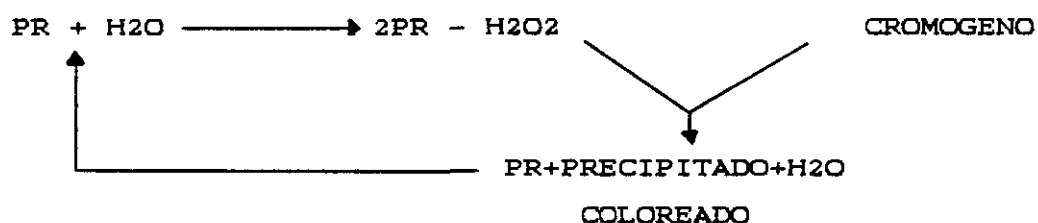
- Solución de lavado.

Tras la aplicación de un anticuerpo, o del complejo PAP, siempre debe realizarse un lavado cuidadoso con un tampón, siendo aconsejable utilizar PBS 0,01M, o bien, TBS 0,05M a un pH 7,2-7,6.

Se puede añadir al tampón, un detergente no iónico, como puede ser el Nonidet P40 al 0,01%, para facilitar la elución de los anticuerpos no específicamente unidos.

- Revelado de la peroxidasa.

El revelado de la peroxidasa se lleva a cabo mediante la producción de un precipitado insoluble local, por acción de dicho enzima con el sustrato, H_2O_2 , para formar un complejo PR- H_2O_2 , el cual reacciona sobre una sustancia, cromógeno, capaz de ceder electrones, originándose una molécula coloreada, que es el precipitado observado al M/O. Completando el ciclo, de nuevo la PR reacciona con más sustrato, produciendo nuevo precipitado coloreado, amplificándose así la reacción:



Como cromógenos, se pueden utilizar diferentes sustancias, entre las que caben destacar:

a. DAB: 3,3 Diaminobenzidina 4HCl.

Este producto, señalado como posible carcinógeno, hoy en día, no se le considera como tal, ya que se carece de pruebas fundadas. Esto no quiere decir que no sea manejado con ciertas precauciones. Podemos preparar una solución stock, a partir de la cual, realizamos la solución definitiva del baño de incubación, con lo cual, nos evitamos hacer pesadas repetidas. Como disolventes de la solución stock, podemos usar:

- 1)N N Dimetilformamidaguardar de 0 a -4°C
2)Etilenglicolmonometil eterguardar a -20°C

El baño de incubación se prepara, inmediatamente antes de usarlo, de la forma siguiente:

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| 1) DAB-4HCl | 5 mg. |
| 2) TRIS 0,05M pH 7,6 | 10 ml. |
| 3) H ₂ O ₂ 3% | 30 pl. |

Como precauciones a tener en cuenta, podemos señalar:

- 1) Preservar la solución de la acción directa de la luz.
- 2) Si aparecen precipitados, filtrar la solución antes de uso. El pH de la soluciones debe ser de 7,6, pero se ha señalado que la reacción coloreada es más intensa de realizarse a un pH 5-6.

Para incrementar y modificar la coloración del precipitado, se han propuesto varios métodos:

1ª) Tratamientos post-revelado.

- Ac. ósmico 0,1-1%. El precipitado se oscurece y se vuelve más electrodensó.
- Nitrato de plata-Ac. Tioglicólico. Se procede según sigue:

I) Solución ac. tioglicólico-HCl 4 h.

Ac. tioglicólico 20 ml.

HCl 37% 5 ml.

H₂O 75 ml.

II) Lavado en agua destilada 3x5 min.

III) Sol. reveladora, mezcla partes iguales 10-20 min.

Stock A) Carbonato sódico 5%

Stock B) Mezcla argéntica

- Nitrato amónico 0,2 gr.

- Nitrato de plata 0,2 gr.

- Ac. tungstosilícico 1,0 gr.

- Formaldehído 37% 0,5 ml.

- H₂O 100 ml.

- Sulfato cúprico. Se incuba durante .. 5 min.

CuSO₄ · 5H₂O 0,5 gr.

H₂O 100 ml.

NaCl 0,9 gr.

2ª) Aditivos a la solución reveladora PR-H₂O₂

- Cloruro níqueloso (NiCl₂)

DAB 10 mg.

TRIS 0,05M pH 7,6 10 mg.

NiCl ₂ 8%	50 micro l.
H ₂ O ₂ 3%	30 micro l.
- Cloruro cobaltoso (CoCl ₂ . 6H ₂ O)	
DAB-H ₂ O ₂ - TRIS.....	40 ml.
CoCl ₂ . 6H ₂ O (25 mM) 6%	1 ml.

- Imidazol, a una concentración 0,01-0,05M.

Debemos recordar que la solución DAB, no debe contener ácido de sodio, ya que éste actuaría como inhibidor competitivo de la PR.

Si la preparación histológica contiene mucha hemosiderina, es difícil reconocer las zonas positivas, distinguiéndolas de los depósitos de hemosiderina. Para salvar este problema, podemos hacer dos cosas, o bien hacemos una tinción previa para hierro (Azul de Prusia), la cual nos señalará los depósitos de hemosiderina, o bien eliminamos a ésta, lo que podemos conseguir, mediante uno de estos dos métodos:

- Ac. Oxálico al 5% 1.24 h.
- Ditionito sódico 1% en tampón acetato pH 5 5 min.

Se estas aplicaciones se realizan con posterioridad a la incubación con DAB, se logra reducir la tinción de fondo.

Entre otros cromógenos se pueden utilizar, además de la DAB (Diaminobenzidina) , que es la que se ha utilizado en este estudio , los siguientes:

- AEC: 3 Amino-9 Etilcarbazol.
- HANKER-YATES: Pirocatecol - p - Fenilendiamina.
- 4 CLORO - 1 NAFTOL.
- & NAFTOL - PIRONINA

Pasaremos a describir el esquema básico para la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa, recomendado por Palacín (240).

IV. 3. 7. 1. TÉCNICA DEL (PAP). ESQUEMA BÁSICO.

TECNICA DE LA PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA (PAP).

Palacin recomienda el siguiente esquema de trabajo para realizar la técnica del PAP.

- 1ª) DESPARAFINAR, hasta alcohol absoluto.
- 2ª) BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDOGENA.
H₂O₂, 0,1-3% en alcohol metílico 100% 30 min.
- 3ª) HIDRATACION PROGRESIVA
Usar alcoholes decrecientes, hasta H₂O destilada
- 4ª) TRATAMIENTO ENZIMATICO
Es opcional, pudiéndose utilizar: pronasa, tripsina, pepsina
... etc.
- 5ª) SUPRESION DE LA TINCION DE FONDO
PBS pH 7,2 + 5% SNC + 1% SAB 30 min.
Decantar la preparación sin secarla.
- 6ª) ANTICUERPO PRIMARIO ESPECIFICO
Producido, generalmente, en conejo y diluido, según su
concentración, temperatura y tiempo de actuación en PBS pH =
7,2 + 5% SNC + 1% SAB.
- 7ª) LAVADO, en 3 cambios sucesivos de PBS pH 7,2 30 min.
- 8ª) ANTICUERPO "PUENTE"
De cerdo anti-IgG de conejo, diluido 1:20-1:50 en PBS
..... 30 min.
- 9ª) LAVADO, en 3 cambios sucesivos de PBS pH 7,2 30 min.
- 10ª) INCUBACION EN PAP
De conejo, diluido 1:60-1:200 en PBS pH 7,2 + 5% SNC + 1%
SAB 30 min.
- 11ª) LAVADO, en 3 cambios sucesivos de TRIS bufer 0,05M pH 7,4
..... 30 min.
- 12ª) REVELADO DE LA PEROXIDASA

DAB-HCl	5mg	HANKER-YATES	7-15mg	AEC	2mg
TRIS 0,05M	10ml	TRIS 0,01M	10ml	NN DIMETIL	0,5mg
pH 7,6		pH 7,6		FORMAMIDA	
H2O2 3%	0,03ml	H2O2 3%	0,03ml	TAMPON ACETATO	9,5ml
				pH 5,2	
				H2O2 3%	0,1ml
3-7 min.		5-10 min.		20-40 min.	

13ª) LAVADO en agua destilada.

14ª) INTENSIFICACIÓN DEPÓSITO CROMÓGENO

Sólamete en el caso de revelar con DAB o HY Ac. ósmico 0,1-1% o 0,5% sulfato de cobre5 min.

15ª) LAVADO en agua destilada.

16ª) TINCIÓN DE CONTRASTE

Heatoxilina; Rojo nuclear; verde metilo; Azul metileno; Verde luz.

17ª) MONTAJE DE LA PREPARACION

Revelado con DAB o HY, aclarar y montar en DPX.

Revelado con AEC o con 2Cl-1 Naftol, montar en medio acuoso, sin deshidratar ni aclarar.

Sobre este esquema recomendado por Palacín en nuestro trabajo se han realizado modificaciones, encaminadas a simplificar la técnica, sin perder calidad en los resultados.

Se refiere al lector al capítulo V.2 donde se especifica con detalle la metodología empleada en nuestro trabajo.

IV. 3 . 8. CONTROL DE CALIDAD DE LAS TÉCNICAS IHQ.

Al realizar un estudio con técnicas de inmunohistoquímica es importante poder garantizar la fiabilidad de estos métodos ,para ello, deben establecerse rigurosos controles .

Estos controles son similares para el PAP o el resto de las técnicas empleadas en IHQ.

Los más importantes son:

- *Sustitución del anticuerpo primero, específico, por PBS.
- *Sustitución del anticuerpo primero, específico, por suero no inmune.
- *Sustitución del anticuerpo primero, específico, por otro anticuerpo no relacionado con el antígeno que estamos investigando.
- *Sustitución del anticuerpo segundo, puente, por PBS.
- *Absorción del anticuerpo primero, específico, con el antígeno específico correspondiente.
- *Dilución progresiva del anticuerpo específico.
- *Utilización de anticuerpos monoclonales, en el caso de que en un estudio se utilicen Ac. policlonales.
- *Utilizar anticuerpos específicos, frente a un mismo antígeno, pero provenientes de fuentes diversas.
- *Incubar sólo con PAP.
- *Realizar la técnica, conjuntamente en el tejido problema y en muestras tisulares ya conocidas, positivas y negativas para el antígeno en cuestión, comparando los resultados.

IV.3 . 9 . PROCEDIMIENTOS DOBLES

En determinados casos, es importante demostrar la ubicación de dos antígenos diferentes en grupos celulares diversos. Tal es el caso v.gr. de la adenohipófisis, donde se quiere identificar la localización de dos tipos celulares responsables de la elaboración de dos hormonas diferentes. En otros casos, es interesante localizar células B con producción de Igs diversas, o bien, de cadenas K y Landa.

En estos procedimientos dobles, deben tenerse presentes una serie de factores:

- * Debe utilizarse, para la demostración de cada antígeno, una sucesión de anticuerpos producidos en animales de diferente especie, a los que corresponde la otra cadena de anticuerpos que

localizan al segundo antígeno. Además, no se deben dar, aunque sean de especies animales diferentes, reacciones cruzadas entre ellos.

* Caben dos posibilidades básicas, con múltiples variantes:

-Procedimiento secuencial: Primero, se completa hasta el revelado, los diferentes pasos para detectar un antígeno y, a continuación, se pone en práctica de nuevo la técnica, con los anticuerpos adecuados, para identificar el segundo antígeno.

Este método es muy largo y laborioso, por lo que es más cómodo realizar las incubaciones de cada paso equivalente, conjuntamente como luego veremos.

Para evitar que la segunda secuencia de aplicación de anticuerpos, pueda tener reacción cruzada con los de la primera, una vez realizado el primer revelado, podemos practicar una remoción de dichos anticuerpos (Igs), mediante diferentes procedimientos de elución:

- HCl 1N
- Dimetilformamida 10%
- Tampón glicocola 0,2M pH 2,3 en NaCl 0,5M, durante 45 min.
- Electroforesis a 20 v/cm en tampón glicocola pH 2,2 y dimetilformida al 30%.
- Ac. peryódico 0,01M, durante 10 min., seguido de NaBH₄ 0,1 mg/ml. durante otros 10 min.
- Procedimiento simultáneo: Dado que la técnica anterior es muy larga y laboriosa, se han ideado procedimientos, en los que la incubación de cada paso equivalente, realiza conjuntamente. Así, en el primer paso, se mezclan, convenientemente diluidos cada uno, ambos anticuerpos. En el segundo paso, también se aplican, conjuntamente, ambos anticuerpos puente y, lo mismo sucede con el tercero. Los revelados se hacen uno detrás del otro.
- Procedimiento mixto: Se aplican, simultáneamente, ambos anticuerpos específicos y, posteriormente, primero la secuencia anticuerpo puente PAP y, después, la secuencia

anticuerpo puente GAG, para proceder a revelar, en primer lugar, la PR y, posteriormente, la Glucosa oxidasa.

* Se deben utilizar, como marcadores, 1 o 2 enzimas, que conduzcan a la formación de productos terminales de distinto color.

* La forma habitual, consiste en demostrar un antígeno por el método PAP y otro, por el del Puente-Ig no marcada-Enzima, utilizando la fosfatasa alcalina

Sin embargo, hoy en día, podemos utilizar dos métodos equivalentes, ya que cada enzima se halla integrada dentro de un complejo enzima-Ig anti enzima, bajo la forma de: PAP, GAG o APAAP.

IV . 4.

**PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS
EN EL ESTUDIO: CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS**

IV.4.

PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO:CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS

A continuación haremos una revisión bibliográfica sobre los anticuerpos monoclonales que se han utilizado en este estudio agrupándolos en los que son destinados contra filamentos intermedios (keratinas (AE1/AE3, PKK1 y CAM 5.2), vimentina y desmina), estudiaremos también otros antígenos tisulares asociados como el EMA, el S -100, antígeno H del grupo sanguíneo, el Factor VIII y otros anticuerpos (Alfa-1-antitripsina, Alfa-feto-proteína, K1 67 y un grupo de anticuerpos monoclonales que estudian antígenos de riñón y urotelio (URO 1, URO 5 y URO 10).

IV.4. 1 FILAMENTOS INTERMEDIOS

Los filamentos de tamaño intermedio (10nm) se encuentran en el citoplasma de la mayoría de los tipos celulares (172), (243), (11) (222).

Estos filamentos tienen un diámetro entre 6 y 25 nm, los microfilamentos (6nm) y los microtúbulos (25nm).

Los filamentos intermedios fueron primariamente descritos por Virtanen et al. en 1968 (248) basados en observaciones con el microscopio electrónico.

Resulta interesante que constituyendo estos filamentos la mayor fracción de las células se conoce muy poco sobre su función específica. Se ha propuesto que servirían como anclaje del núcleo dentro de la célula (248). La mayor parte del conocimiento de los mismos se basa en hallazgos inmunohistoquímicos y en anticuerpos monoclonales específicos contra ellos.

Con la experiencia obtenida se ha podido concluir que la expresión de estos filamentos intermedios está generalmente conservada en las células tumorales (248) (187) (90).

Los filamentos intermedios están compuestos por 5 tipos de proteínas distinguibles entre sí por medios inmunológicos y bioquímicos:

1. KERATINAS: presentes en todos los epitelios son proteínas insolubles entre 40-70 Kd. (91) (163) (172).
2. VIMENTINA: encontrada en células mesenquimales, en astrocitos (172), en células de Sertoly (89), en células de músculo liso de tejido vascular (91) (92), células endoteliales y células sanguíneas. Es un polipéptido de 58 Kd.
3. DESMINA: se encuentra fundamentalmente en células musculares (46) (154) es una proteína de 50 Kd.
4. NEUROFILAMENTOS: típico de células neuronales (156).
5. FILAMENTOS GLIALES: típico marcador de los astrocitos.

En la tabla IV. 1. 1. se especifican las células donde se pueden encontrar cada uno de estos filamentos intermedios.

TABLA IV. 4. 1. 1.

EXPRESION DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS EN CELULAS NORMALES

Keratina/Citokeratina	Vimentina	Desmina
Epitelio Escamoso	Fibroblastos	Musculo esqueletico
Urotelio	Celulas de Schwann	Musculo Cardiaco
Mesotelio	Celulas endoteliales	Celulas musculares lisas viscerales
Epitelio simple de varios tractos		Linfocitos
Monocitos/	Algunas celulas macrofagos	musculares lisas del tejido vascular
Epitelio Glandular	Condrocitos	Celulas de Purkinje
Neumocitos	Melanocitos	
Hepatocitos	Celulas de Langerhans	
Epitelio renal tubular	Celulas de Sertoli	
Epitelio folicular tiroideo	Celulas de la granulosa	
Celulas corticales adrenales	Epitelio de las lentes oculares	
	Podocitos Glomerulares	
<hr/>		
GFAP	Neurofilamentos	
Astroцитos (varias formas)	Axon de las celulas nerviosas	
Celulas de tipo ependimal	Cuerpo celular y dendritas	
tanocitos	(capas neuronales granulares en el cerebelo son negativas para los neurofilamentos)	

De Miettinen 1984 (167)

Los filamentos intermedios se pueden dividir dentro de tres grupos segun publica Steinert:

- Tipo 1: Keratinas acidas
- Tipo 2: Keratinas neutras y basicas
- Tipo 3: Vimentina, desmina, GFAP (estos filamentos intermedios son de forma muy diferente a las keratinas y constituyen un grupo diferente de estas.

IV. 4. 2 KERATINAS

De los 5 tipos de filamentos intermedios las keratinas son los más complejos.

La expresión de las keratinas de los epitelios ha sido más estudiada que la del resto de los filamentos intermedios.

En principio se pensó que las Keratinas se expresaban solo en los epitelios queratinizados, pero mas tarde se ha comprobado por diversos estudios inmunohistoquímicos (88),(90),(93),(187), que se encuentran también en epitelios no queratinizados, tales como epitelios glandulares de órganos internos.

Se han hecho estudios de las mismas por electroforesis en gel (172), técnicas inmunológicas y translaciones in vitro con mRNAs (ref. tomada de (223)).

Probablemente haya una 30 keratinas diferentes.

Steinert en su trabajo de 1985 (223) define principios de expresión de las keratinas:

1. Hay dos subfamilias o subunidades, una subfamilia ácida ($\text{pH} < 5.5$) y una subfamilia neutrobásica ($\text{pH} > 6$) que es conocida como tipo 1 y tipo 2 de los filamentos intermedios.
2. Los diferentes epitelios expresan una limitada selección de keratinas, siempre en pares consistentes en una subunidad de tipo 1 y otra subunidad de tipo 2.
3. Los pares de subunidades expresadas son específicos para un fenotipo epitelial.
4. En los llamados pares de keratinas, las keratinas de tipo 2 son usualmente de 7-10 kd. más largas que las de tipo 1.
5. Hay una correlación directa entre la complejidad del epitelio y el tamaño de las unidades expresadas.
6. Cuando el estado de diferenciación de un epitelio se interrumpe por, transformación maligna, enfermedad hiperproliferativa, o manipulación experimental se producen notables excepciones en estas normas.

Las implicaciones biológicas y significado de estos patrones permanecen poco claras.

Steinert en su trabajo de revisión encuentra que la vitamina A aumenta la expresión de las keratinas tipo 1 y tipo 2 en los epitelios secretores simples, pero suprime la expresión de las de tipo 1 y 2 en la epidermis.

Hay datos que sugieren que la expresión de distintas subunidades de filamentos intermedios está regulada trascripcional y/o post-transcripcionalmente, más que a nivel de translación.

Los diferentes tipos de keratinas son funcionalmente diferentes, los primeros datos obtenidos sobre las keratinas sugieren que las secuencias de las subunidades de keratinas pueden estar relacionadas con sus patrones de expresión y posibles funciones.

Por bioelectroforesis, Moll et al (172) han catalogado un total de 19 citokeratinas, usualmente de 2 a 10 keratinas se encuentran en cada tipo de epitelio. Los patrones de citokeratinas también aparecen idénticos en tumores primarios y en sus metástasis según publica Moll en su trabajo 1982.

En la tabla IV. 4. 2. 1. se exponen, parcialmente, los resultados sobre la distribución de citokeratinas, publicadas por Moll (172). En la tabla se recogen los hallazgos de Moll en los epitelios del tracto genital femenino, y en sus carcinomas.

En algunos tumores algunas keratinas que aparecen en el tejido normal no lo hacen en el tejido neoplásico, esto puede reflejar una selección durante el crecimiento tumoral o que el tipo de célula del que dependía la expresión de esa citokeratina no es predominante en el tejido tumoral.

La distribución de las keratinas y demás filamentos intermedios en general está bien conservada en las neoplasias (157) (248).

Las keratinas 8 y 18 aparecen como las primeras expresadas en la embriogénesis, Jackson et al 1980.

La composición de las keratinas en los diferentes epitelios varía dependiendo del tipo celular, del estadio de desarrollo, de la diferenciación del crecimiento y del estadio de la enfermedad

(136). (47) se ha demostrado que la mayoría de las keratinas se pueden agrupar en 3 grupos relacionados con 3 factores:

- a) Tipo de epitelio celular (simple versus estratificado)
- b) Diferenciación (piel, córneas, esófago)
- c) Estado del crecimiento celular.

Esta agrupación implica que diferentes keratinas pueden ocupar un diferente papel durante la diferenciación epitelial (47).

Igualmente importante como expresa Cooper (47) la determinación de la composición de las keratinas de cada carcinoma con un panel de anticuerpos monoclonales nos enseñará sobre la naturaleza y en algunos casos sobre el posible origen del tumor.

También expone Cooper que el uso de los anticuerpos monoclonales para el estudio de las keratinas jugarán un papel importante en la clasificación de los tumores epiteliales, en los mecanismos de diferenciación del epitelio normal y neoplásico, opinión también expuesta Ghosh (196) "la heterogenicidad de las citokeratinas ofrece la posibilidad de utilizar anticuerpos antikeratinas para el estudio de la diferenciación normal y resolver problemas en la biología de los tumores y en patología clínica".

Con la tinción con anticuerpos monoclonales para keratinas nos encontramos una tinción citoplásmica positiva, filamentosa aunque a veces las keratinas pueden perder esta configuración y aparecer como agregados en células en mitosis o en células pretratadas con citochalasina y colcemid (146).

TABLA IV. 4. 2. 1

DISTRIBUCION DE CITOKERATINAS EN DIFERENTES EPITELIOS Y CARCINOMAS SEGUN MOLL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	(68)	(66.5)	(63)	(59)	(58)	(56)	(54)	(52.5)	(64)	(56.5)	(56)	(55)	(54)	(50)	(50)	(48)	(46)	(45)	(40)
Epitelio normal																			
Superficie epitelial ovárica							+	+										+	+
Trompa							+	+										+	+
Endometrio (proliferativo)							+	+										+	+
Endocérnix							(+)	+										+	+
Endocérnix con metaplasia escamosa					+		+	+									+	+	+
Exocérnix y unión endo-exocervical						+							(+)				+	+	+
Exocérnix	+	(+)		+	+	+					(+)		+	+	+	(+)	(+)		(+)
Vagina, tercio superior	+	(+)		+	+	+					(+)		+	+	(+)	(+)	(+)		
Epidermis del labio mayor de la vulva	+	(+)			+					+	+			+	(+)				
Neoplasmas																			
Carcinoma de ovario (n=8)							+	+				+						+	+
Adenocarcinoma de endometrio (n=5)							+	+										+	+
Adenocarcinoma de cérvix (n=2)							+	+									+	(+)	+
Células escamosas de carcinoma de cérvix, no keratinizado (n=6)					+	+	+	+					+	(+)	+	(+)	+	(+)	+
Células escamosas de carcinoma de cérvix, keratinizado (n=2)					+	+							+	+		(+)	+		+

FIGURA IV. 4.2.1

ESQUEMA DE CLASIFICACION DE SUBFAMILIAS DE KERATINAS

Cornea	Piel	Piel	Cornea
64K	65-67K	56,5K	55K
Otros E.E.			Otros E.E.
59K			51K
.....			
	58K	50K	Epitelios Estratificados
	56K	48K	
.....			

	54K	46K Epitelios Simples
	52K	45K	
		40K	
	B (II)	A (I)	

En el esquema anterior se clasifican las keratinas en subfamilias según sean keratinas ácidas (tipo I) o básicas. Las keratinas debajo de las líneas de asteriscos se expresan fundamentalmente en epitelios simples (excepto la 46 Kd. que está presente en keratinocitos hiperproliferativos) y las keratinas por encima de la línea de asteriscos se expresan en epitelios estratificados. Las keratinas marcadas en negrita se expresan en todos los epitelios estratificados, neoplasias y en enfermedades hiperproliferativas y en cultivos.

Tomado de Cooper 1985 (47).

La posibilidad de obtener reacciones cruzadas no deseadas con el uso de anticuerpos monoclonales para detección de filamentos intermedios es aparentemente alta por el hecho de que diferentes filamentos intermedios presentan secuencias muy parecidas, a veces pueden presentarse reacciones cruzadas de queratina y desmina con la vimentina (248) aunque con el perfeccionamiento en la obtención de los anticuerpos se va consiguiendo cada vez disminuir las reacciones cruzadas.

La identificación inmunocitoquímica de las distintas clases de filamentos intermedios expresadas por las células neoplásicas es de reconocido valor dentro del arsenal diagnóstico, dado que, en general, las células tumorales retienen la capacidad productora de filamentos intermedios en los tejidos de los que se deriva (Gabianni 1981 y Osborn y Weber 1983) (94), (187).

Se pensó en principio que la mayoría de las células expresaban un solo tipo de filamento intermedio pero son muchas las publicaciones que ilustran la coexpresión de 2 o más filamentos intermedios en los tejidos (Miettinen et al 1984) (167).

Estos hallazgos en tumores pueden ser particularmente útil para el entendimiento de su biología.

El epitelio celómico es el precursor de los ductos müllerianos, y este tipo de células que componen la superficie del ovario adulto están caracterizadas por un patrón específico de citokeratinas (números 7, 8, 18 y 19). (173).

Estos cuatro polipéptidos encontrados en el mesotelio son probablemente idénticos a las citokeratinas designadas como 55, 52, 44 y 40 Kd. por Wu et al (referencia tomada de Moll (173)) en su estudio de células mesoteliales en cultivo.

Este mismo patrón se encuentra también en los epitelios de la parte superior del tracto genital femenino, como la trompa, el endometrio y el endocervix. No estando sin embargo restringido este patrón al tracto genital femenino, pudiendo encontrar el mismo patrón en epitelios como los conductos pancreáticos y de la vesícula.

Las partes inferiores del tracto genital femenino que tienen un origen embriológico cuestionable (153) como ya se comenta en el capítulo dedicado a la revisión de la embriología, están caracterizados por un epitelio escamoso estratificado, no keratinizado (exocérvix y vagina). Correspondientemente el patrón de las citokeratinas del exocérvix y de la vagina es completamente diferente del patrón del mesotelio y células endometriales, ofreciendo una mayor complejidad en los polipéptidos y siendo similar este patrón a los de otros epitelios escamosos estratificados no keratinizados como el esófago y la lengua.

El exocérvix sin embargo, no siempre es homogéneo en el patrón de citokeratinas. La mayor porción de la exocérvix y de la vagina expresan una citokeratina de 68 Kd. (173).

Correspondiente a los dos principales tipos de patrones de citokeratinas del epitelio genital normal, los carcinomas derivados de estos epitelios pueden ser divididos en dos grupos principales caracterizados por su diferente patrón de citokeratinas. Las citokeratinas de los adenocarcinomas ováricos y endometriales son idénticos a los presentados en el mesotelio normal que alinea las células del ovario y al endometrio normal, indicativo del mantenimiento del patrón de las células de su origen. Este hecho se observa también en los adenocarcinomas del tracto gastrointestinal.

El otro tipo de patrón de citokeratinas se observa en los carcinomas escamosos del exocérvix. Así como en el tejido de origen los componentes característicos del epitelio estatificado son los polipéptidos 5 y 6. La expresión de estas citokeratinas es estable durante la transformación maligna. El polipéptido 19 que es un componente más escaso en el exocérvix normal aparece como un componente importante en el correspondiente carcinoma.

La presencia de la citokeratina 17 en los adenocarcinomas cervicales puede ayudar a distinguir estos carcinomas de los carcinomas endometriales, diagnóstico diferencial que a veces es dificultoso.

En la tabla anterior (IV. 4 .2. 1.) se expone la distribución de las citokeratinas en los tejidos normales y tumores del tracto genital femenino descritos por Moll en 1983 (173).

Pasaremos a continuación a describir las características de cada uno de los filamentos intermedios utilizados en el trabajo.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO:

CITOKERATINAS

IV. 4. 3. AE1 / AE3

En el estudio se han utilizado el anticuerpo monoclonal AE1/AE3 (anticuerpo monoclonal contra keratinas epiteliales humanas) de Hybritech Incorporated.

Características: Las keratinas son un grupo de proteínas insolubles en agua que constituyen una clase de filamentos intermedios, aparecen en la epidermis y en otros tejidos epiteliales (88). Estos filamentos forman parte del complejo citoesqueleto de 15 a 20 tipos diferentes de keratinas han sido identificadas por electroforesis.

De 2 a 7 keratinas se encuentran usualmente en cada tipo de epitelio.

La composición de las keratinas depende del tipo epitelial del estadio de diferenciación, del desarrollo embrionario del ambiente de crecimiento celular y de la diferenciación patológica del epitelio.

TABLA IV. 4. 3. 1.

CARACTERISTICAS DE LAS CITOKERATINAS AE1 - AE 3

Anticuerpos		
Antígeno	AE1 Keratina Humana	AE3 Keratina Humana
Especificidad de tinción	Capa basal epidermica y la mayoría de los epitelios	Toda la epidermis y todos los epitelios
Antígeno de Keratina	50Kd. y 56,5Kd.	58Kd. y 65-67Kd.
Ig subclase	IgG1	IgG1

Datos de (88) y (237)

Fuente: Células esplénicas de Balb/c ratón inmunizado con keratinas epidérmicas humanas fusionado con células de mieloma P3. Los anticuerpos monoclonales son obtenidos de líquido ascítico de ratón Balb/c y purificados.

Preparación de los tejidos: Se pueden utilizar las keratinas AE1 AE3 tanto en tejidos en congelación como en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina. Battifora (18), entre otros autores ,encuentran mejores resultados utilizando tejidos en congelación.

Aplicaciones: Recientes resultados obtenidos por Sun et al han mostrado que los anticuerpos monoclonales antikeratina AE1 AE3 reconocen keratinas de subfamilias ácidas(A) y básicas (B), respectivamente.

Sus resultados indican que la combinación de estos dos anticuerpos reconocen prácticamente todas las keratinas epiteliales humanas.

El pool de anticuerpos AE1 /AE3 nos provee de un medio de identificación para las keratinas con el que difícilmente nos encontraremos falsos negativos en la identificación de células epiteliales.

Los anticuerpos AE1 AE3 han mostrado una alta especificidad para las keratinas y no muestran reacciones cruzadas con ningún otro elemento del citoesqueleto(237).

Estos anticuerpos son altamente estables, y se pueden utilizar para test con Elisa además de para inmunotinciones en tejidos en congelación y en parafina.

El anticuerpo AE1/ AE3 es útil para la identificación positiva de células epiteliales tanto normales como patológicas en secciones de tejidos o en cultivos celulares así como para la distinción entre carcinomas y no carcinomas.

Dabbs (65) publica haber encontrado expresión positiva con este anticuerpo en todos los tumores ováricos epiteliales estudiados.

Aguirre (3),1989,encuentra positividad con el AE1/AE3 en el 40% de los tumores Células Claras, en 3 de 15 tumores de Células de la granulosa y el 100% de los tumores de Sertoli.

Dilución: La casa comercial recomienda una dilución con buffer a pH 7.0-8.0 a concentraciones de un microg./ml o menos para las inmunotinciones para conservar el anticuerpo y minimizar la tinción de fondo. Advierte la casa comercial que diluciones a menos de 1 mg./ml. puede causar desnaturalización del anticuerpo recomendando el uso de 1.0% de gelatina o el 1% de albúmina serica bovina como diluyente.

IV. 4. 4. PKK. 1

Hemos utilizado el anticuerpo monoclonal PKK.1 de Labsystems.

CARACTERÍSTICAS DEL ANTICUERPO

1. El PKK.1 es una anticitokeratina obtenida frente a keratinas aisladas de una línea de células epiteliales (LLCK-PK) de riñón de cerdo.

Los anticuerpos son obtenidos por la fusión de células esplénicas de BALB/C de ratón inmunizado con células NS-1.

2. El anticuerpo PKK.1 reacciona con gran número de citokeratinas incluyendo cultivos de células epiteliales LLCK-PK, MDCK.8, HeLa y A431.

PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Los mejores resultados se obtienen con tejidos en congelación y cultivos celulares fijados con metanol enfriados a -20°C , aunque también se puede utilizar en tejidos de parafina después de un tratamiento apropiado (248).

TABLA IV. 4. 1.

REACTIVIDAD DE DIFERENTES CARCINOMAS CON KERATINAS Y CITOKERATINAS

	EK	PKK 1	PKK3
Carcinoma Escamoso			
Piel	+	+	--
Pulmón	+	+	--
Carcinoma ductal Mamario	+	+	+
Adenocarcinoma			
Pulmonario	+	+	+
Colonorectal	+F	+	+
Prostático	+F	+	+
Conductos biliares	+	+	+
Renal	+F	+	+
Carcinoma Adenoide quístico			
Parótidas	+	+	+
Carcinoma hepatocelular	--	+	+
Carcinoma Tiroideo			
Papilar	+	+	+
Folicular	--	+	+
Carcinoma adenocortical	--	+	+
Linfoepitelioma Nasofaríngeo	+	+	NA

F: Reacción focal

Tomado de Miettinen 1984 (167)

USO DEL ANTICUERPO

* El PKK.1 reacciona preferentemente con tejido glandular y simple de células epiteliales incluyendo células proximales y distales del túbulo distal del riñón. Células acinares de la glándula salivar, células foliculares del tiroides, hepatocitos, células epiteliales del timo, células mesoteliales y uroteliales.

En la piel sólo reacciona con células glandulares y epiteliales del folículo piloso.

* Se presentan tinciones positivas con el PKK.1 en diferentes tipos de carcinomas que incluyen adenocarcinomas, mesoteliomas y sus metástasis (167).

Viale, 1988 (247), publica positividad para este anticuerpo en todos los tumores epiteliales ováricos, tinción que aparece de forma homogénea en estos tumores.

IV.4. 5. CAM. 5.2

Hemos utilizado en el trabajo la anticitokeratina CAM.5.2. de Becton Dickinson.

CARACTERÍSTICAS DEL ANTICUERPO

1. **Especificidad:** Citokeratina humana de bajo peso molecular.
39 Kd. 43 Kd. y 50 Kd.
Números 8, 18 y 19 del catálogo de Moll (172).
2. **Antígeno:** Epitelio secretor en tejido humano.
No reacciona con epitelio estratificado escamoso
Reacciona de forma positiva con un gran número de epitelios adultos (163).

TABLA IV.4. 5. 1.

INMUNOTINCIONES CON CAM 5.2 EN TEJIDOS ADULTOS NORMALES EN PARAFINA

TEJIDOS	REACCION
Células del epitelio Ovárico	++
Epitelio de la Trompa	++
Endometrio	
Epitelio	++
Estroma	----
Cérvix	
Endocervical	++
Ectocervical	----

Nota: ++ = Intensamente positivo ---- = Negativo

Tomado de Makin 1984 (163)

TABLA IV 4. 5.2.

TINCIÓN CON CAM 5.2 EN TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN EN FETOS DE 20 SEMANAS

TEJIDOS	REACCIÓN
Riñón	
Túbulo proximal	++
Túbulo distal	++
Colector	++
Cápsula de Bowman	++
Ovário	
Estructuras ductales en mesovario 75% de células de cordones sexuales	++

Nota: ++ = Tinción intensamente positiva.

Tomada de Makin 1984 (163).

3. Clon: El CAM.5.2 deriva de la línea celular de ratón P3/NS1/1-AS4-1 con células esplénicas de BALB/C de ratón inmunizado.

4. Ig: IgG 2a de ratón cadena pesada y cadena ligera Kappa de células esplénicas y de células de mieloma.
5. Fuente: Suero y/o líquido ascítico de BALB/C de ratón.

PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Se pueden utilizar tejidos en congelación o tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (163).

SÍNTESIS DE SU APLICACIÓN EN INVESTIGACIÓN

1. Para diferenciación en carcinomas indiferenciados de su origen epitelial o no.
2. Identificación de células epiteliales en metástasis de nódulos linfáticos y metástasis óseas.

Pasaremos a describir algunos de los hallazgos obtenidos con la aplicación de este anticuerpo.

- 1) Van Eyken 1989 (242) describe positividad en los hepatocitos de la colestasis hepática y en la hepatopatía alcohólica, tanto de la citokeratina 19, identificada con el CAM.5.2. y de la citokeratina n°7.

La positividad en la expresión para la citokeratina 19 sólo aparece en la enfermedad hepática avanzada, por tanto el proceso no es una mera repetición de la secuencia de aparición de estas citokeratinas en la ontogénesis, ya que en el feto aparece primero la inmuno reactividad a la citokeratina n° 19.

Tanto el mecanismo de este cambio como su posible aplicación clínica deberán obtenerse de nuevos estudios.

- 2) Makin (163) estudia la reacción del CAM.5.2. frente a un gran número de epitelios y tumores, resultados presentados en la tablas IV. 4. 5. 1. y IV. 4. 5. 2..

Los patrones con CAM.5.2. no son selectivos para los diferentes tipos de epitelios pero si son homogéneos, por lo que en opinión de Makin estos serían mejores marcadores epiteliales para la diferenciación del origen de un tumor que el EMA o HMFG1.

El CAM.5.2. es de gran utilidad en la diferenciación entre carcinoma y linfoma, melanoma o sarcoma (194).

La reacción positiva del CAM.5.2. en tejidos de origen neuroendocrino precisa de más estudios para su análisis.

Franke 1979 (88) también publica que las citokeratinas están presentes prácticamente en todas las células epiteliales.

Franke en estudios en rata (88) observa:

- En el epitelio del oviducto, en tejidos en congelación: tinción con anticitokeratinas en la zona subapical en células secretoras y ciliadas, de menor intensidad que en el endometrio. Los cílios no presentan tinción.
- Endometrio: encuentra una tinción positiva para células ciliadas y secretoras.
- Miometrio y células mesenquimales: aparece una negatividad para las citokeratinas.
- Tejido conectivo en útero: aparece positivo para la vimentina.
- Miometrio: aparece positivo a la desmina.

3) Las metástasis conservan el tipo de keratina de los tumores primarios, en general por lo que su tipificación es útil en el estudio del origen del tumor.

Makin (163) realiza en su estudio preparaciones con CAM.5.2 en tejido fetal (Tabla IV. 4. 5. 2.) encontrando una tinción positiva en estructuras ductales, en el mesovario y en el 75% de las células de cordones sexuales.

4) Czernobilsky (59) 1985 publica la tinción positiva del epitelio ovárico con keratinas 18 y 19 y no con keratinas 10/11 y 13/16.

5) También se han encontrado tinciones positivas para el CAM.5.2. en plasmocitomas.

6) El CAM.5.2. se ha utilizado como marcador de transformación maligna y de potencial invasivo en la neoplasia cervical:

- Recientes estudios han determinado el patrón de expresión de citokeratinas en el epitelio normal y carcinomas del tracto genital femenino (172) (192).

- Moll et al. (172) demostró que el epitelio del ectocérvix no expresa las citokeratinas 8, 18 y 19 (identificados con anticuerpos CAM.5.2.) mientras que encuentra expresión positiva en el carcinoma escamoso de las citokeratinas 8 y 19 y con frecuencia de la 18.

- Bobrow 1986 (29) encuentra el CAM.5.2. como un útil marcador para delimitar la transformación maligna y el potencial invasivo del carcinoma cervical, encontrando positividad con el CAM.5.2 en todos los carcinomas invasivos.

- Por el contrario Rajú 1988 (193) encuentra sólo el 28% de carcinomas invasivos de cérvix positivos al CAM.5.2. y el 1,5 de CIN III positivos y encuentra negatividad con el CAM.5.2. en el CIN I y en el CIN II y en el ectocérvix normal. Encuentra positividad también en la metaplasia escamosa endocervical.

7) Respecto a tumores ováricos Stamp (221) demuestra en tumor juvenil de células de la granulosa algunas células positivas para el CAM.5.2. y no así en células de la teca.

Aguirre et al 1989 (3) encuentra el 100% de células positivas con el CAM.5.2. en el carcinoma "Small Cells" carcinoma y solo 1/3 de células positivas en tumores de células de la granulosa.

En la tabla IV. 4. 5. 3 se resumen los hallazgos de Benjamín 1987 (19) en un estudio de tumores de cordones sexuales y del estroma con CAM 5.2. y vimentina. Para este trabajo utiliza tejidos fijados en formol y embebidos en parafina. Para la inmunotinción con el CAM. 5.2. utiliza la técnica de la fosfatasa alcalina y para la vimentina utiliza la técnica de PAP.

En este mismo trabajo investiga con estos anticuerpos en ovarios fetales y adultos normales, concluyendo que los patrones que se expresan en los tumores existen desde estadios precoces del desarrollo.

*Hallazgos en ovario:

1.Ovarios de 15

semanas: Encuentra positividad para las citokeratinas en el cortex aunque no de forma homogénea, apareciendo unas células positivas y otras negativas.

En la parte profunda del córtex algunas de estas células citokeratin positivas se encuentran colocadas alrededor de los ovocytos, formando los folículos primordiales precoces.

Algunas células con apariencia similar a las células citokeratin positivas también expresan la vimentina.

2.Ovarios de 20-22

semanas: Describen estos autores un aumento en el número de células de pregranulosa que expresan vimentina y citokeratinas.

3. Ovario de 40

semanas: Las células de la granulosa expresan citokeratinas y vimentina, mientras que las células de la teca y el componente estromal expresan sólo vimentina.

4.Epitelio ovárico: Expresan las citokeratinas estudiadas en todos los casos, mientras que las células vimentin positivas sólo aparecen de forma focal y en algunos casos.

Czernobilsky et al (59) encuentran expresión positiva para las citokeratinas y la vimentina en las células de la granulosa en ovarios humanos.

Los resultados con estas inmunotinciones no son homogéneos ya que otros autores obtienen resultados diferentes, por ejemplo Miettinen (168) (169) encuentran que los cordones

sexuales y las células de la granulosa expresan vimentina pero no citokeratinas.

Estos resultados son interesantes en vista del disputado origen epitelial de las células de la granulosa, dado los resultados contradictorios de diferentes autores, por el momento no se pueden sacar conclusiones definitivas en base a los datos obtenidos con estas técnicas de inmunohistoquímica.

Benjamín (19) concluye que la expresión de la vimentina y de la citokeratina expresada en las células de la granulosa y de la teca permanecen en la vida adulta y tienen una traducción paralela en las neoplasias derivadas de estas células.

Según los datos expuestos por Benjamín la presencia de citokeratina y vimentina en las células de la granulosa y las células de Sertoli-Leydig así como en algunos carcinomas ováricos limitaría el valor de estos marcadores para el diagnóstico diferencial para estos tipos de tumores.

TABLA IV.4. 5. 3.

EXPRESIÓN DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS EN TUMORES DE CORDONES SEXUALES

TUMOR	CASOS	CITOKERATINA	VIMENTINA
Tumor en células de la granulosa			
Adulto	22	15	22
Juvenil	4	3	4
Total	26	18	26
Tecoma	11	0	11
Fibroma	6	0	6
Tumores en células de Sertoli-Leydig	3	3	3
Tumores en cordones sexuales con nódulos anulares	1	1	1

Nota: En tejidos fijados con formol y embebidos en parafina con técnica de PAP.

Tomado de Benjamín 1987 (19).

8) En los túbulos renales se expresan las citokeratinas reconocidas por el CAM 5.2 y por el PKK1. Durante el desarrollo glomerular hay una expresión transitoria de citokeratinas de bajo peso molecular, en el epitelio visceral glomerular, pero en el adulto, sólo el epitelio parietal expresa las citokeratinas (87).

OTROS FILAMENTOS INTERMEDIOS:

IV.4. 6. VIMENTINA

Hemos utilizado en el trabajo el anticuerpo monoclonal antivimentina de Labsystem.

CARACTERÍSTICAS DEL ANTICUERPO

1) Es una inmonoglobulina IgG obtenida contra proteínas del citoesqueleto aisladas de células epiteliales de riñón de cerdo.

El anticuerpo es obtenida por fusión de células esplénicas de ratón inmunizado por células Ns1.

2) El anticuerpo reacciona sólo con un polipéptido de 58 Kd. (248) en diferentes términos. No reacciona con otros filamentos intermedios ni con otras proteínas asociadas a la vimentina.

PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Se puede utilizar tanto en tejidos en congelación como en tejidos en parafina despues de la realización de un tratamiento específico con proteasa (127).

UTILIZACIÓN

Se ha encontrado en células endoteliales, macrófagos, condrocitos, músculo liso de tejido vascular (91), (92) ,(188) en células de Sertoli (89) (172), en astrocitos (172), en células

epidérmicas de Langerhans y melanocitos (162) y en células de la granulosa del ovario (5) (3).

Algunas células de músculo liso contienen junto con la vimentina, desmina.

Igual ocurre en células de la astrogliá y en células ependimales que contienen vimentina junto con filamentos gliales (GFAP) (256).

En el desarrollo embrionario en algunos casos como en células de músculo liso vascular aparece antes la vimentina que la desmina, la misma secuencia de aparición la observamos también en el desarrollo de las células gliales.

Su utilización ha servido para esclarecer la histiogénesis de algunos tumores de origen no aclarado como el sarcoma alveolar de partes blandas o del mioblastoma granular.

También se ha observado que fibrosarcomas, liposarcomas, endoteliomas y el histiocitoma fibroso maligno contienen Vimentina.

Se ha encontrado coexpresión de Vimentina y citoqueratinas en el 53% de los carcinomas renales, no encontrándose expresión de la Vimentina en el túbulo normal (125).

El uso de la inmunohistoquímica para el estudio de los filamentos intermedios ha servido para aclarar el origen de algunos tumores.

Sarcomas que no tienen origen muscular como los linfomas y melanomas expresan curiosamente reactividad con la vimentina (248)

- En muchos carcinomas la vimentina tiñe el componente estromal entre las células carcinomatosas en apoyo al origen exclusivamente mesenquimal del tejido estromal (172). También se encontraron células vimentina positivas en algunas metástasis de carcinomas.

- El tejido conectivo del miometrio es keratin negativo tiñéndose específicamente con la vimentina (88) en cambio

obtenemos que el músculo liso del miometrio se tiñe exclusivamente con la desmina.

- Bonazzi 1983 (30) estudia sarcomas uterinos y ováricos encontrando que la vimentina marca sólo algunas células neoplásicas así como el endometrio, en cambio la desmina marca la mayoría de las células neoplásicas.

En los tumores mesodermales mixtos encuentra el estroma positivo tanto para desmina como para la vimentina.

- Niehans 1988 (182) publica la reacción positiva para la vimentina en:

- * 30% de seminomas/disgerminomas
- * 19% de carcinomas embrionarios
- * 16% de tumores del Saco Vitelino
- * 4% de coriocarcinomas
- * 100% de teratomas vimentinas positivos en los elementos mesenquimales; el epitelio de estos tumores es vimentina negativo

Lifschitz-Mercer 1988 (157) encuentran en un estudio inmunohistoquímico del tumor de Brenner una tinción intensa en fibroblastos estromales así como en la superficie del epitelio.

- Encontramos también otras referencias positivas respecto al estroma en el Tumor de Brenner, Santini (203) y Grone (111) en estos trabajos se encuentra también la positividad para la vimentina en el C. renal y no en el urotelio normal.

TABLA IV.4. 6. 1.

INMUNOTINCION CON VIMENTINA Y KERATINAS EN NEOPLASIAS HUMANAS

		INMUNOFLUORESCENCIA			
MATERIAL	DIAGNOSTICO	VIMENTINA		KERATINA	
		Celulas tumorales	Estroma	Celulas tumorales	Estroma
Mama	Carcinoma lobular de mama	N	P	P	N
Utero	Sarcoma mesodermal mixto	P	P	N	N
	Adenocarcinoma	N	P	P	N
Ovario	Tumor de Brenner	N	P	P	N
	Cistoadenocarcinoma seroso papilar	N	P	P	N
Vulva	Melanoma maligno	P	P	N	N
Vagina	Adenocarcinoma endometriode pobremente diferenciado	N	P	P	N
Pelvis	Metastasis de cistoadenocarcinoma seroso papilar	N	P	P	N

Tomado de Ramaekers 1982 (194) N= Negativo , P= Positivo

- Dabbs publica en 1988 (65) un interesante trabajo sobre el perfil de filamentos intermedios en tumores epiteliales ováricos utilizando en el estudio keratinas (AE1/AE3, 35 BH11, 34 BE12), CEA y vimentina encontrando:

* Todos los tumores epiteliales ováricos estudiados expresan las keratinas de forma uniforme encontrando la expresión de la keratina de alto peso molecular 34BE12 sólo de forma focal.

* La vimentina se coexpresa con las citokeratinas en el 42% de los carcinomas serosos, en el 41% de los carcinomas endometrioides y en el 7% de los carcinomas de células claras.

La expresión positiva de la vimentina en los carcinomas serosos es focal y aparece sólo en el 20% del tejido, patrón similar al observado en el mesotelio.

* Las keratinas 15 y 18 son idénticas en el mesotelio y en los epitelios Mullerianos, incluyendo endometrio, endocérvix y parte superior de la vagina (173).

Dentro de los epitelio Mullerianos sólo el epitelio de superficie ovárico y endometrio expresan vimentina in vivo (64) (168) y (59), así como en sus neoplasias.

- Dabbs en 1976 (64) refiriéndose a carcinomas endometriales y endometrioides no encuentra correlación en la expresión de la vimentina con el grado de diferenciación del tumor.

En este trabajo encuentra una positividad para la vimentina tanto en el adenocarcinoma de endometrio y en el endometrioma ovárico con un patrón citoplásmico.

TABLA IV.4. 6. 2

FRECUENCIA DE LA VIMENTINA EN CARCINOMA OVÁRICO

CARCINOMA	
Seroso	8/19 (42%)
Endometrio	5/7 (71%)
Células claras	1/13 (7%)
Mucinosos	0/8
Brenner	0/1

Tomado de Dabbs 1988 (65).

- Viale 1988 (247) encuentra que los tumores mucinosos y el tumor de Brenner son negativos para la vimentina y positivos para las citokeratinas. Encuentra una positividad del 71% para los

carcinomas endometrioides y del 65% para el endocarcinoma de endometrio.

- Stamp (221) publica una reacción positiva para la vimentina en el tumor juvenil de células de la granulosa.

- Aguirre et al 1989 (3) utilizan la vimentina junto con el EMA y el S-100 para intentar esclarecer el origen epitelial o no de las células germinales, de los tumores "small cels", encontrando un patrón antigénico no superponible entre tumores de célula de la granulosa y los tumores "small cels":

- * Tumores de células germinales: 1/3 de positivos para el S-100, 100% positivo para la vimentina, negativo para el EMA

- * Small cells :Negativo para el S-100, 50% positividades para la vimentina; 1/3 positivos para el EMA.

Por tanto este patrón antigénico no apoya la teoría de Ulbright 1987 (239), que encuentra en estos tumores coexpresión de citokeratinas, vimentina y alpha-antitripsina, sobre el origen de este tumor en las células germinales, aunque tampoco lo excluye.

Aguirre (3) concluye que los hallazgos de su trabajo aportan un dato más sobre la antigenicidad del tumor aunque no aclara el origen del mismo.

- Viale 1988 (247) encuentra en todos los casos de epitelio normal del tracto genital femenino una tinción citoplásmica y difusa de citokeratinas (CAM.5.2.).

En un número considerable de células epiteliales, ováricas, tubáricas y endometriales aparece coexpresión de la vimentina y del CAM.5.2. mientras que de forma constante no aparece actividad para la vimentina en la mucosa endocervical.

- * El porcentaje de células expresando vimentina en el epitelio celómico ovárico varía del 10 al 100% mientras que es menos variable (más del 50% en el epitelio de las trompas de falopio y en el endometrio).

* En el estudio con doble marcaje con CAM.5.2 y vimentina se ha encontrado una diferencia en la localización celular con estos anticuerpos:

- CAM.5.2. = Distribución citoplásmica
- Vimentina = Positivo en la porción basal de la célula.

Este patrón es constante en el epitelio celómico ovárico y en la trompa mientras que en endometrio varía con el estadio pre o post ovulatorio:

- Vimentina = * patrón fascicular paralelo al eje axial de la célula en el periodo proliferativo.

* polo basal del citoplasma en fase secretora

- Los tumores mucinosos benignos, BL y malignos no expresan vimentina junto con la citokeratina así como tampoco aparece esta coexpresión en el tumor de Brenner.
- En los tumores de células claras del ovario considerados de origen Mulleriano y relacionados con carcinomas endometrioides por Scully en 1967, Viale (247) encuentra datos que apoyan esta relación, encontrando en estos tumores un gran número de células neoplásicas que coexpresan vimentina y citokeratina (como lo hacen las células endometriales).
- El estudio de Viale muestra que los tumores epiteliales ováricos presentan un patrón heterogéneo en la expresión de los filamentos intermedios.

TABLA IV.4. 6. 3

EXPRESIÓN DE LA CITOKERATINA Y LA VIMENTINA EN 83 TUMORES OVÁRICOS EPITELIALES

Diagnósticos	Nº de casos	Nº de casos positivos	
		CK	Vim
Tumores serosos			
benigno	16	16	15
borderline	3	3	3
maligno	15	15	9
Total	34	34	27
Tumores mucinosos			
cistoadenomas	16	16	0
borderline	3	3	0
cistoadenocarcinoma	10	10	1
Adenocarcinomas			
endometrioides	12	12	4
Carcinoma de células claras	4	4	4
Tumores de Brenner	4	4	0

Tomado de Viale (247)

- Las investigaciones de Viale demuestran que los diversos histiotipos de tumores epiteliales ováricos exhiben una diferente capacidad para la coexpresión de CAM.5.2 y vimentina de acuerdo con su diferenciación morfológica.

* Epitelio mulleriano (epitelio de trompa endometrio o endocérnix)

* Otros epitelios (transición o intestinal)

Los diferentes oncotipos de tumores epiteliales muestran un origen común en el epitelio celómico ovárico con posibilidad de diferenciación en los dos tipos de epitelio expuesto (Scully 1977).

La mayoría de los tumores epiteliales ováricos tienen una semejanza al epitelio mülleriano (Cummins 1974, Blaustein 1981, Czernobilsky 1982).

Los hallazgos de Viale apoyan la similitud entre el epitelio normal del tracto genital femenino y los diferentes tumores ováricos (serosos, endometrioides y mucinosos), mostrando una

expresión paralela en los patrones de filamentos intermedios con los tejidos con los que se les ha relacionado histológicamente en su origen.

En contra de lo publicado por Moll en 1983 Viale demuestra que el epitelio de la trompa coexpresa vimentina y keratinas del mismo modo que el epitelio celómico.

Los adenocarcinomas de trompa de Falopio retienen la capacidad de expresión de los filamentos intermedios de las células de que son origen .

Las citokeratinas y vimentinas se coexpresan igual en tejido normal y tumoral pero con una compartimentalización que probablemente refleja propiedades funcionales aún funcionales de las 2 proteínas cuando se expresan simultáneamente.

Las publicaciones sobre la expresión de la vimentina en tumores serosos son contradictorias.

Puts 1987 y Miettinen 1983 encuentran una respuesta positiva de forma muy focal y restringida, mientras que otros autores (Ramaekers 1982, Bonazzi 1983, Czernobilsky 1984) no detectan ninguna reacción positiva de la vimentina en estos tumores.

- Encontramos una variación en la expresión de la vimentina según el momento del ciclo ovárico en el endometrio encontrando posibilidad para la vimentina en el endometrio proliferativo y negatividad en el endometrio secretor (64).

- Cordón Cardo (50) estudiando el tracto urinario encuentra vimentina positivo todo el glomérulo, tanto en el feto como en el adulto, sólo algunas células del túbulo son positivas y encuentran negatividad en el epitelio de transición y en los túbulos colectores.

- Grone (111) observa la expresión de la vimentina en el riñón con lesión renal aguda y con lesión crónica, apuntando que la vimentina puede ser un indicador de actividad regenerativa y proliferativa de las lesiones tubulares.

- La vimentina también ha sido utilizada para aclarar el origen de los podocitos y de las células mesangiales (220).

Se ha encontrado tinción positiva en el glomérulo humano en células endoteliales, podocitos y células mesangiales por lo que es sugestivo el origen mesenquimal de los podocitos y células mesangiales. En ratas no aparece esta tinción positiva, demostrando esto una diferencia de expresión de los filamentos intermedios según las especies.

- La expresión de la vimentina tradicionalmente considerada como un marcador de células de origen mesodermal ha sido descrita en algunos tumores epiteliales, esta expresión se ha atribuido a la regresión a un tipo de células embrionarias más primitivas, según Chase. (Ref. de 65) acuerdo con la teoría de desdiferenciación propuesta para tumores epiteliales.

Raymond publica en 1989 (198) la utilidad de la expresión de la vimentina en tumores de mama.

Encuentra positiva la expresión de la vimentina en tumores ductales infiltrantes (encontrando una tinción citoplásmica difusa) aparece una relación de la expresión más intensa en relación con el grado histológico del tumor, siendo más positiva la expresión cuanto más desdiferenciado es el tumor. La expresión es inversa a la expresión de los receptores estrogénicos y de la edad de la paciente no encuentra relación entre el tamaño del tumor o con la aparición de metástasis axilares.

No encuentra expresión de la vimentina en carcinomas lobulares, fillodes maligno o carcinoma tubular.

Propone la expresión de la vimentina como un nuevo factor pronóstico independiente de las metástasis axilares o del grado de diferenciación.

- En el carcinoma de pulmón también se ha evidenciado la coexpresión de la vimentina en tumores pobremente diferenciados (198).

TABLA IV.4. 6. 4

EXPRESIÓN DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS DE TUMORES DE CORDONES SEXUALES. ESTROMA.

Tumor	Nº de casos	Citokeratina (CAM 5.2)	Vimentina
Tumores en células de granulosa			
Adulto	22	15	22
Jóven	4	3	4
Total	26	18	26
Tecoma	11	0	11
Fibroma	6	0	6
Tumores en células de Sertoli-Leydig	3	3	3
Tumores en cordones sexuales	1	1	1

Tomado de Benjamin. 1987. (19).

IV.4. 7. DESMINA

El anticuerpo utilizado es el anticuerpo monoclonal antidesmina de Chemid Credential

Clono: DE - U- 10

Anticuerpo: IgG 1 de ratón obtenido de ascitis producido por hibridación producido por células de mieloma con células esplénicas de ratón inmunizado con desmina purificada de estómago de cerdo.

Reconoce un polipéptido de 55 Kd.

Uso: La desmina es uno de los 5 grupos intermedios encontrada predominantemente en músculo esquelético, cardíaco y músculo liso (248) (172) (47) (88), también se encuentra en tumores derivados del músculo liso (leiomiomas y rabdomiosarcomas).

En el músculo esquelético y en el músculo cardíaco los filamentos de desmina se encuentran localizados en las bandas Z y

en los discos. Hay algunos tipos de músculo liso como la capa muscular lisa de la aorta que carecen de desmina (186).

Preparación de tejidos: Se pueden utilizar tanto tejidos en congelación como tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, después de un tratamiento específico con proteasa o tripsina (127).

Experiencia con la desmina: Se han utilizado la desmina y la vimentina para el estudio de tumores mesenquimales, para hacer el diagnóstico diferencial de su origen muscular o no (167).

Cordón Cardo (50) encuentra negativo para la desmina todo el epitelio urinario tanto en el tejido adulto como fetal en humano (riñón, uréter y vejiga urinaria).

Encuentra reacción positiva en las capas musculares de el uréter, la vejiga y el músculo liso vascular (en pequeños vasos encuentra una tinción débilmente positiva o negativa).

En rabdomiosarcomas y leiomiosarcomas se han encontrado reacciones desmina positivas (248).

El rabdomioma vaginal también se ha encontrado desmina positivo así como mioglobina positivo.

Los leiomiomas uterinos también se han objetivado como desmina positivos (94).

El miométrio se tiñe exclusivamente con la desmina y de forma muy marcada (88).

Bonazzi, 1983 estudia la expresión de los filamentos intermedios en tumores ováricos y uterinos (30), encontrando que los leiomiosarcomas uterinos y ováricos, los sarcomas estromales del endometrio y los sarcomas ováricos presentan la mayoría de las células tumorales positivas para la desmina.

En los tumores mixtos mesodérmicos tanto en el útero como en el ovario la mayoría de las células estromales son positivas para la desmina o la vimentina y se observa en estos tumores que el componente epitelial expresa diferentes keratinas.

Estos resultados muestran que la mayoría de las tumoraciones sarcomatosas del ovario y del útero expresan fundamentalmente filamentos intermedios marcadores del tejido muscular.

Se han descrito tinciones positivas del estroma en tumor de Brenner y en el urotelio, presentando también el tumor de Brenner y el urotelio tinción positiva para la vimentina (203).

Ramaekers (195) no encuentra expresión de la desmina en tumores ováricos (Seroso, Carcinoma indiferenciado y Tumor de Brenner), ni en el adenocarcinoma de endometrio o de cérvix., ni en el adenocarcinoma de vagina. (Ver Tabla IV. 4. 7. 1.).

TABLA IV. 4. 7. 1.

DETECCION INMUNOHISTOQUIMICA DE FILAMENTOS INTERMEDIOS EN ADENOCARCINOMAS HUMANOS.

Localización	Diagnóstico	Nº	Células tumorales		
			K	V	D
Ovario	Adenocarcinomas póbrememente diferenciados	1	++	--	--
	Cistoadenocarcinoma seroso papilar	3	+ / ++	--	--
	Tumor de Brenner	1	++	--	--
Utero	Carcinoma adenoescamoso de endometrio	1	++	--	--
	Adenocarcinoma de cervix moderadamente diferenciado	1	+ / ++	--	--
	Adenocantoma del cuerpo uterino moderadamente diferenciado	1	++	--	--
Vagina	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	++	--	--
Pelvis	Metástasis de cistoadenocarcinoma papilar seroso en el ovario	1	+ / ++	--	--

Tomado de Ramaekers 1983 (195)

K= Keratina, V= Vimentina, D= Desmina

ANTÍGENOS TISULARES ASOCIADOS**IV.4. 8. EMA (ANTI-ANTÍGENO HUMANO EPITELIAL DE MEMBRANA)**

En el presente trabajo se ha utilizado el anticuerpo monoclonal antiema de Dako.

Clono: E - 29

Antígeno: El EMA es un anticuerpo monoclonal obtenido en preparaciones contra proteínas de membrana de células grasas de leche humana obtenido en ratón.

**Preparación
de los**

tejidos: Se puede utilizar tanto en tejidos en congelación como en tejidos en parafina, siendo esto último una ventaja de este anticuerpo al poderse utilizar retrospectivamente en preparaciones. Gatter 1984 (97) y 1982 (96) Ellis 1984 (74).

Utilización: Aunque en principio se presumía que el EMA se expresaba sólo en células epiteliales, se ha encontrado que el EMA presenta reacciones positivas en algunos linfomas.

En 1977 Ceriani (44) obtiene un antisuero contra la leche humana que reacciona con el tejido mamario normal y las células de carcinoma de mama.

En 1983 Ormerod et al (184) reportan que el EMA reconoce glicoproteínas de alto peso molecular.

En 1985 Cordell (41) y Turnbull en 1983 (238) publican que el EMA reconoce un amplio espectro de epítomos de alto peso molecular, en un rango de 265 - 400 Kd.

1985 Heyderman (120) - Heyderman 1979 (121) y Sloane (218) estudiando la distribución del EMA encuentra que éste reconoce un carbohidrato que se encuentra en una amplia variedad

de células epiteliales, normales y tumorales y en células mesoteliales.

Se han descrito reacciones positivas del EMA con algunos linfomas no Hodgking (particularmente en T-Cell linfomas y en "histiocitosis malignas") también aparece positividad en células de Reed-Stenberg en casos de Hodgking con predominio linfocítico.

También se ha encontrado reacción positiva con el EMA en casos de linfocitos normales en sangre expuestos a virus humano tipo II, según demuestran Delsol et al en 1984 (70) utilizando tres tipos de anticuerpos antiema (E29, HMFG 2 y LICR. LOM/M8).

También se ha encontrado tinciones positivas en plasmocitomas y mieloma múltiple (255).

Experiencia con el EMA:

1) Se ha utilizado fundamentalmente para el diagnóstico diferencial de tumores anaplásicos (97)

Delsol 1984 (70) reporta que si se utilizan citokeratinas conjuntamente con el EMA en tumores anaplásicos y para la identificación de carcinomas, en base al hallazgo de que células linfoides expresan con frecuencia este antígeno y a que las células B tienden a perder el antígeno leucocitario común cuando se diferencian en células plasmáticas, se puede realizar un falso diagnóstico de carcinoma en el caso de que encontremos un tumor anaplásico de células plasmáticas que exhiba EMA positivo en ausencia de antígeno leucocitario común (perdido en la desdiferenciación tumoral).

2) Para el diagnóstico in vivo de extensión y recidiva de tumores epiteliales ováricos con técnicas de radioinmunoescintigrafía, con buenos resultados utilizando el EMA y el HMFG2 (Human Fat Globule Membrane) (Shepherd 1987 (216)).

3) Para la inmunolocalización e irradiación de células neoplásicas guiada por anticuerpos, después de administración intravenosa de antiEMA marcado (116).

4) Para la demostración de metástasis, de otra forma indetectables de carcinoma de mama en huesos y nódulos linfáticos regionales (199) (250).

5) Para la demostración de células carcinomatosas en derrames pleurales y peritoneales. Epenetos 1982 (77), Ghosh 1983 (103), Guzmán 1988 (115).

Guzmán presenta en un estudio (115) de ascitis en adenocarcinoma seroso papilar ovárico la detección de células carcinomatosas con el EMA.

Fundamentan la importancia de dicho estudio el que es el adenocarcinoma ovárico el tumor primario que con más frecuencia produce líquido peritoneal maligno; representando el 32% de los casos. Dado que por estudios citológicos convencionales sólo se identifica correctamente el 76% de los casos, es útil utilizar una técnica con anticuerpos monoclonales con la cuál el 100% de los casos estudiados aparecen positivos.

Estudios ultraestructurales en ascitis por carcinoma ovárico objetivan células tumorales con largos microvilllis similares a las células de mesotelioma.

En tinciones con EMA se pueden diferenciar ambos tipos de células por el patrón que presentan. Aunque la tinción al EMA es positiva en ambos casos, células de mesotelioma y células de carcinoma ovárico, se pueden diferenciar por el patrón de tinción celular, Guzmán 1988 (115) y (114). En los casos estudiados en el trabajo de Guzmán (115) del 30 al 95% de todas las células en cada uno de los casos presentaba positividad para el EMA.

También describe en este trabajo que del 3 al 30% de las células en algunos casos son positivos para el LeuM1, anticuerpo que se pensaba originariamente sólo reaccionaba frente a granulocitos (215).

En resumen, el estudio mencionado demuestra la importancia de la utilización de anticuerpos monoclonales, en este caso del EMA para estudio de ascitis secundaria a carcinomas ováricos, dado que aunque no siendo totalmente específicos,

aumenta la positividad en el diagnóstico de un 76% a un 100% respecto a diagnósticos realizados con técnicas citológicas convencionales.

6) Estudios en tumores ováricos:

- Bradgate et al 1989 (32) encuentran una diferencia significativa en tumores no mucinosos, que presentan una gran positividad en la tinción con el EMA.

En estudios de tumores ováricos, no encuentran diferencias respecto al grado histológico ni al estadio clínico ni al pronóstico en los patrones de tinción con el EMA.

TABLA IV. 4. 8. 1.

RELACIÓN ENTRE EL TIPO HISTOLÓGICO DE TUMOR OVÁRICO Y EL GRADO DE TINCIÓN CON EL EMA

Grado de tinción	Tipo histológico		P*	t+
	Mucinoso (n = 9)	No mucinoso (n = 27)		
Anti- EMA				
0-3	5	1	0.002	0.36
4-6	4	26		
* Test de Fisher				
+ Kendall				

Tomado de Bradgate 1989 (32).

TABLA IV.4. 8. 2

CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL TUMOR DE BRENNER Y UROTELIO

Antígenos	BBT	MBT Normal	Urotelio Neoplásico	Urotelio
CEA	+	+/-	+	+/-
Alfa-FP	--	--	--	--
Beta-HCG	--	--	--	--
EMA	+	+	+	+
Keratina de amplio espectro	+	+	+	+
Citokeratina A	+	+	+	+
Citokeratina C	--	+/-	--	--

Tomado de Santini 1989 (203)

* Santini presenta la similitud entre el uroepitelio y las células epiteliales del tumor de Brenner, dato que viene a apoyar la teoría de la histogénesis del tumor de Brenner que apoya que dicho tumor derivaría del epitelio celómico ovárico (una modificación del mesotelio pélvico) por un proceso de metaplasia urotelial (212) (217) o bien el origen en los nidos de Walthard (considerados como un epitelio metaplásico de transición del mesotelio pélvico ocasionalmente localizado en el ovario).

Estos datos presentados por Santini estarían en oposición a las teorías que expresan el origen del tumor de Brenner en células del estroma ovárico (109), en el mesonefros (20) en células de la granulosa (217) o en células germinales (262).

-Aguirre et al 1989 (3) encuentra un 100% de tumores de la granulosa negativos para el EMA, 1/3 de los tumores de células claras positivos para el EMA, en un estudio realizado con un panel de anticuerpos monoclonales (vimentina, S-100, CAM-5.2 y EMA) para intentar definir el origen

celular del tumor, no encontrando resultados concluyente

-Nihans (182) encuentra un patrón diferenciador en tumores de células germinales en los que el tumor aparece fosfatasa alcalina placentaria positiva y EMA negativo al igual que describe Aguirre en su trabajo (3).

-Hitchcock 1989 (124) presenta un estudio con el NCRC11 (anticuerpo monoclonal contra células humanas de carcinoma de mama).

El determinante antigénico reconocido por este anticuerpo es glicoproteína de alto peso molecular (>400 kD) (191).

Este anticuerpo tiene reactividad con un antígeno de membrana epitelial y según este autor, los epítopes reconocidos por este anticuerpo pueden estar estrechamente relacionados, o incluso ser idénticos a los que el EMA reconoce. Por este motivo consideramos interesante exponer aquí los resultados obtenidos por Hitchcock, con este Ac. estrechamente relacionado con el EMA. Como apunta este autor son escasas los trabajos sobre distribución del EMA en epitelios normales y neoplásicos del tracto genital femenino.

La siguiente tabla resume los patrones de inmunoreactividad con el NCRC11.

TABLA IV.4. 8. 3

PATRONES DE INMUNOREACTIVIDAD CON NCRC 11 PARA OVARIO Y ENDOMETRIO NORMAL, NEOPLASIAS DE OVARIO Y ENDOMETRIO Y ENDOMETRIO HIPERPLASICO.

	Positividad Heterogénea	Positividad Difusa
Endometrio proliferativo	S	
secretor		C + S + secr
hiperplasia quística	S	
hiperplasia atípica	S	
adenocarcinoma		C + S + secr
tumor Mulleriano mixto	C + S	
Tumores de ovario		
seroso benigno		C + S
Seroso borderline		C + S + secr
seroso maligno		C + S + secr
mucinoso benigno	NEG or C + S	
mucinoso borderline	NEG or C + S	
mucinoso maligno	NEG or C + S	
Endometrio (maligno)		C + S + secr
No clasificado (maligno)		C + S + secr

C = Tinción citoplásmica; S = Tinción de la membrana apical;
secr = Secreción intraluminal

Tomado de Hitchcock 1988 (124).

* Resultados:

a) Cérvix, vagina, vulva:

En todos los casos el epitelio escamoso de vulva, vagina y ectocérvix son negativos.

* Todos los carcinomas invasivos de cérvix, vagina y vulva presentan tinciones positivas tanto citoplásmicas como de membrana.

En el caso de la vagina y la vulva el carcinoma intraepitelial muestra una tinción muy débil, no es así el caso en el carcinoma intraepitelial de cérvix que es claramente positiva.

* En los casos de metaplasia escamosa cervical aparece una positividad tanto en la membrana citoplásmica como en el citoplasma.

b) El epitelio endocervical presenta positividad en las membranas apicales tanto en el adenocarcinoma endocervical como en los tumores mucinosos ováricos. Aparecen tinciones heterogéneas dentro del tumor, encontrando en el mismo zonas no inmunoreactivas y otras zonas donde aparecen tinción positiva en citoplasma y membrana.

No aparece un patrón claramente diferenciador entre tumores benignos, "borderline" y malignos en los tumores mucinosos.

c) Endometrio:

El endometrio aparece positivo en la membrana celular mostrando diferencias en los patrones a lo largo del ciclo ovárico.

La tinción citoplásmica aparece sólo en los adenocarcinomas.

d) Trompa:

Todos los casos de epitelio tubárico normal presentan tinción positiva con el NCRC11 en las membranas apicales.

e) Ovario:

Los quistes de inclusión ováricos presentan tinción positiva en membrana apical.

Los tumores serosos muestran extensamente una tinción positiva tanto citoplásmica como de membrana, encontrando este mismo patrón en el resto de los tumores epiteliales no mucinosos.

- Brown(35) con otro anticuerpo epitelial de membrana (HMEG1), similar al EMA encuentra que este es un marcador de atipias en las células glandulares cervicales.

- Cordell(48), también encuentra que el EMA se comporta como marcador tumoral en el adenocarcinoma cervical y de endometrio.

- Crowther et al 1989 (58) en un trabajo de revisión sobre la utilidad de la utilización de anticuerpos monoclonales en el estudio de tumores epiteliales ováricos, concluyen:

* Hasta el momento ninguno de los marcadores tumorales es suficientemente específico, tanto en el estudio en el suero, como para la radioinmuno localización en el diagnóstico de pacientes con masas abdominales.

En pacientes con tumores ováricos conocidos, las medidas seriadas con marcadores tumorales y la radioinmunolocalización puede ayudar en el diagnóstico de recurrencia de la enfermedad y durante el tratamiento, aunque como también concluye Granowska et al 1988(107) los hallazgos negativos no garantizan la ausencia de enfermedad.

* La radioinmunoterapia con anticuerpos monoclonales está en la infancia dado que el uso de anticuerpos monoclonales (la mayoría de ellos obtenidos en ratón) pueden dar lugar a la enfermedad del suero.

Para un futuro existe la posibilidad de utilización postoperatoria intraperitoneal de anticuerpos monoclonales unidos a drogas citotóxicas, así como su utilización por vía intravenosa.

- Delsol 1984 (70) encuentra una gran positividad del EMA en las tinciones así como en la detección en suero en tumores ováricos no mucinosos, así como en carcinomas endometriales, por lo que podría ser útil su utilización para la motorización de la enfermedad así como para el estudio de metástasis, utilizado en conjunto con otros anticuerpos.

TABLA IV.4. 8. 4.

INMUNOREACTIVIDAD PARA EL EMA EN VARIOS ADENOCARCINOMAS

Tejido	Total	Nº positivo para el EMA	Membrana Apical	Membrana periférica	Citoplasma	Lumina Intracelular
Endometrio	4	4	3	0	4	0
Ovario						
Seroso	6	6	5	1	6	0
Mucinoso	2	2	0	0	2	0
Endometriode	1	1	0	0	1	0

Tomado de Pinkus 1985 (190)

IV.4. 9 S-100

En el estudio se ha utilizado el S-100 de Dako.

Antígeno: El S-100 se aísla de cerebro de vaca como describió Moore (175) pero usando buffers conteniendo 2,5 mM de EDTA y 0,1 mM de 2-Mercaptoetanol.

Una purificación adicional se realiza por cromatografía usando anticuerpos para evitar contaminación de proteínas cerebrales.

Se llama S-100 por que es una proteína soluble en una solución de sulfato de amonio saturada (100%).

Recientemente se ha conocido su estructura, es una mezcla de dos componentes con dos subunidades, alpha-beta (S-100 a proteína) y beta-beta (S-100 b proteína) (132).

Con un peso molecular de 21 Kd. aproximadamente.

La subunidad alpha tiene 10.400 daltons y cuenta con 93 aminoácidos residuales.

La subunidad beta tiene 10.500 daltons y 91 aminoácidos residuales.

La secuencia de alpha y beta es del 58%.

Función

- biológica:**
- 1) Une el Ca a la porción C-terminal de la molécula.
 - 2) También se ha visto que facilita el paso de ácido gamma-aminobutírico a través de la membrana celular del nervio (118).
 - 3) Une al Ca²⁺ positivo y al 2N2 positivo de forma independiente (164).
 - 4) Se ha sugerido que es una proteína ligadora.

- Localización:**
- Encontramos el S-100 tanto en asociación con la membrana como con el núcleo, esto puede representar dos moléculas muy afines con distinta actividad funcional.
 - Se ha demostrado el S-100 en las células de origen endocrino.
 - También se ha encontrado en las células de Schwan.
 - En otros tejidos no neuronales también se ha identificado el S-100 (252): en la piel, los melanocitos y las células de Langerhans, son positivas para el S-100 (99).
- Las células reticulares de los nódulos linfáticos también son positivas para el S-100.
- Se han reportado positivities con el S-100 en túbulos renales de rata, túbulos proximales (50) (171), asa de Henle y en la mayoría de los túbulos colectores (50).
 - Los glomérulos son negativos.
- Este antígeno puede representar un antígeno de diferenciación tardío porque en las nefronas fetales y en el tracto urinario fetal son negativos.
- Las células ductales de las glándulas salivares son también S-100 positivas.

Función: - La presencia del S-100 tanto en las células renales como en las glándulas salivares ofrece la posibilidad de que el S-100 sea un regulador del PH, de los electrolitos y de la concentración del agua dentro de las células.

Experiencia con el S-100:

A. Se ha encontrado positividad con el S-100 en los siguientes tumores:

- 1) Melanomas (145) (99). Casi todos los tumores benignos y malignos de origen melanocítico son positivos para el S-100.
- 2) Cordomas.
- 3) Granuloma eosinófilo.
- 4) Tumores cartilagosos.
- 5) Adenoma pleomórfico de la glándula salivar.
- 6) Tumor de mama (73) (204).
- 7) Tumores de origen glial y astrocítico.
- 8) Tumores del nervio periférico (108) (204).
- 9) Mioepiteliomas y tumor del Wilms (204).
- 10) Tumores de la célula de la granulosa.

B. Se ha sugerido su uso para el diagnóstico diferencial de tumores mesenquimales:

1) Schmitt 1989 describe en un estudio en 159 tumores que todos los carcinomas son negativos para el S-100 excepto el carcinoma de mama y publica la utilidad de la utilización como un marcador tumoral especialmente diferencial de tumores mesenquimales.

2) La positividad del S-100 en el tumor de Wilms apoya la teoría discutida sobre la histiogénesis de este tumor en el neuroectodermo (204).

3) Niehans 1988 (182) en un estudio sobre tumores ováricos encuentra una positividad del S-100 en el 17% de

los teratomas estudiados, sólo en las áreas de diferenciación glial o nervio periférico.

Encuentra este autor una expresión negativa en seminomas, disgerminomas, carcinoma embrionario, tumores del saco vitelino y en coriocarcinomas.

4) Aguirre 1989 (3) en un estudio sobre tumores ováricos encuentra en 1/3 de los tumores de células de la granulosa positividad para el S-100.

Encuentra que los "small cells tumors" son en su totalidad negativos para el S-100, aunque los datos encontrados en este trabajo no son concluyentes, apoyan una diferencia antigénica entre el Tumor de Células Claras y el Tumor de la Granulosa.

5) Un nuevo dato sobre las células en que aparece S-100 lo aporta el trabajo de Mori 1988 (176) que dice: la presencia de células S-100 positivas dispersas en células tumorales en tumores nasofaríngeos, tumores pulmonares y carcinomas gástricos, es un factor de buen pronóstico.

En el carcinoma gástrico encuentra células S-100 positivas en un grupo de pacientes con supervivencia mayor de 10 años y raramente en el grupo de pacientes con supervivencia menor de 10 años. Mori en base a estos datos sugiere la idea de que estas células S-100 positivas juegan un papel en la inmunidad celular.

Los datos obtenidos por Mori concuerdan con lo expuesto por Wolff en 1983 (253) que publica que las células S-100 positivas juegan un papel importante en la inmunidad celular de la piel, servirían para presentar el antígeno a las células T-sensibilizadas estimulando a las células T a producir interleukina-1.

6) Gatter (99) concluye que con anticuerpos monoclonales se puede delimitar la expresión de este y otros antígenos en las células, y que en general los tumores mantienen las características antigénicas de las células donde se originan, recalcando que por tanto el análisis de estos patrones

antigénicos abre unas amplias posibilidades para comprender la histogénesis y facilitar los diagnósticos diferenciales.

IV.4. 10 FACTOR VIII

En el presente trabajo se ha utilizado el FACTOR VIII de Dako.

Inmunógeno: Factor Von Willebrand aislado de plasma humano.

Clono: F8/86

Reactividad: Reacciona con el Factor VIII en las células endoteliales donde muestra un patrón granular (50), también reacciona con el citoplasma de megakariocitos en secciones de médula ósea humana.

Clase: IgG 1 Kappa.

Especimen: Se puede utilizar tanto en tejidos embebidos en parafina, obteniendo mejores resultados si se utiliza tripsina o pronasa previamente (12). También se puede utilizar en tejidos en congelación.

Estructura: El complejo Factor VIII está formado por dos componentes, uno el factor antihemofílico y otro el factor Von Willebrand (50). Son glicoproteínas de 300 y 800 Kd. respectivamente.

El componente Von Willebrand también ha sido llamado "Factor VIII related antigen" y está compuesto por subunidades de disulfitos ligados de 200 y 225 Kd.

Localización: Este antígeno se localiza en el endotelio capilar. En los riñones fetales tiñe intensamente la matriz, este patrón en el riñón puede estar relacionado con la histiogénesis del tejido mesenquimal del riñón y con la neovascularización de la primitiva nefrona. En el riñón fetal no se ha encontrado tinción en ningún otro elemento celular.

La tinción sirve en el riñón para distinguir los vasos recta de la porción del asa de Henle.

IV. 4. 11. ANTÍGENO H DEL GRUPO SANGUÍNEO

El anticuerpo utilizado es el Antígeno H de grupo sanguíneo de Lipshaw.

Antígeno: Es un trisacárido sintético alpha-L-fructosa (1-2) beta-D-galactosa (1-4) beta-D-N-acetyl-glucosamina.

Fuente: Se obtiene en ratón, purificado de líquido ascítico según el método descrito por Bundle 1982 (36).

Clase: IgM.

Especificidad: Grupo antígeno H tipo 2 en membranas del epitelio, endotelio y células rojas del grupo 0.

Especimen: Tejidos fijados rutinariamente y procesados en parafina y en tejidos en congelación.

El antígeno se preserva mejor cuando se utiliza como fijador el formol sublimado.

Localización: Tejidos normales:

- 1) Gérmenes dentarios (244).
- 2) Urotelio (61) (53) (185) (210).
El urotelio fetal expresa siempre el antígeno H.
- 3) Vejiga (148) (185).
- 4) Células epiteliales de túbulos colectores (210).
- 5) Tracto gastrointestinal (68).
- 6) Piel, lengua y laringe (148).
- 7) Ovario (69)
- 8) Endometrio fetal (129).

Tumores:

- 1) Adenocarcinoma de endometrio (129).
- 2) Carcinoma de colon (68)
- 3) Pólipos adenomatosos.
- 4) Carcinoma de vejiga urinaria (148).
- 5) Carcinoma de Cérvix (67)

- 6) Ameloblastomas (244).
- 7) Carcinoma de pulmón (210)
- 8) Carcinoma de mama (210).
- 9) Tumor del saco vitelino (177)
- 10) Carcinoma embrionario (177).

Motzer 1978 estudiando la expresión del antígeno H en tumores de células germinales encuentra una expresión intensamente positiva del antígeno H en los carcinomas del saco vitelino y carcinomas embrionarios no encontrando la expresión de este antígeno en seminomas, por lo que sugiere que este antígeno se puede utilizar como marcador para distinguir entre seminomas y tumores no seminomatosos.

Davidsohn en dos trabajos de 1966 y 1968 (68) (69) reporta que los antígenos A, B y H son detectables en tejidos normales por técnicas de inmunofluorescencia y que se reducen en cantidad o están ausentes en el transcurso de la transformación a carcinoma de los tejidos normales.

Este fenómeno se observa en cambios a adenocarcinoma en:

- * Adenocarcinoma gastrointestinal (68) (251).
- * Adenocarcinoma de ovario (148)(69).
- * Carcinoma escamoso de piel, de laringe y lengua (148).
- * Carcinoma de vejiga urinaria (148) (55) (139).

Cordon Cardo 1988 (55) publica que el urotelio de la vejiga segrega antígenos ABH y que exige una pérdida de la expresión del antígeno en el carcinoma in situ y en el carcinoma invasivo de vejiga. Estos mismos resultados son también publicados por Juhl 1986 (139).

- * Carcinoma de uréter y pelvis renal (61).

Chapman 1983 (61) publica que el urotelio normal y en el carcinoma urotelial no invasivo transicional los antígenos ABH están presentes, mientras que en los tumores invasivos estos isoantígenos frecuentemente están ausentes.

- * Carcinoma de cérvix (67).

Davidsohn 1969 (67) publica un trabajo estudiando la expresión de los isoantígenos ABH en lesiones benignas y malignas del cérvix en tejidos en parafina, con inmunofluorescencia encontrando:

- Reacción positiva en todas las capas celulares excepto en la basal en metaplasias y en displasias igual que en el epitelio normal.

- En carcinomas invasivos de cérvix con metástasis son negativas las tinciones tanto en los tumores primarios como en las metástasis.

- En el carcinoma invasivo sin metástasis y en el carcinoma de cérvix in situ encuentra una reducción importante del antígeno y en algunos casos la ausencia total del mismo.

- Estos hallazgos apoyan lo referido anteriormente en otros tumores respecto a la pérdida de expresión de este antígeno con la transformación maligna.

Davidsohn esboza la teoría de que la pérdida de los antígenos ABH puede ser un indicador de que los tejidos en transformación maligna puedan metastatizar.

Los mismos resultados obtiene en 1985 Teglbjoerg (234) en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina concluyendo que el patrón de anti-H-antígeno no es influenciado por el grupo sanguíneo del individuo y sus resultados concuerdan con los de Davidson en que el H-antígeno puede ser útil en el diagnóstico del cáncer de cervix.

En contradicción con los hallazgos de Davidsohn sobre la pérdida de expresión de los isoantígenos ABH en la transformación maligna, encontramos otros trabajos:

1) Cordon Cardo publica en 1983 (54):

- * Que encuentra expresión positiva de los antígenos ABH en el feto en el tejido de colon y recto.
- * Que aparece pérdida de expresión en el mismo tejido adulto.
- * Que aparece una neosíntesis de estos isoantígenos en el carcinoma colono-rectal.

Hallazgos similares son publicados por Yuan 1985 (257) encontrando una expresión de los isoantígenos ABH en el colon distal y proximal en tejidos fetales, pérdida de expresión de los antígenos en colon fetal en adultos y reexpresión de los antígenos en carcinoma de colon distal.

Estos hallazgos sugieren que estos antígenos se comportan como antígenos oncofetales en el cáncer de colon distal. Estos hallazgos son también publicados por Schoengtag 1984 (205) y Denk 1974 (71).

2) Inke 1987 (129) estudiando la expresión de los isoantígenos ABH en endometrio fetal, endometrio normal adulto y en adenocarcinoma de endometrio encuentra expresión del antígeno H en endometrio fetal independientemente del grupo sanguíneo fetal, apareciendo una tinción en el citoplasma y en la membrana de las células.

En el endometrio adulto encuentra una tinción positiva focal menos intensa que en endometrio fetal para el antígeno H independientemente del grupo sanguíneo.

En el carcinoma de endometrio encuentra una expresión positiva del antígeno H también independientemente del grupo, apareciendo igual que en el feto una tinción tanto del citoplasma como de la membrana celular.

La distribución del antígeno presenta una buena correlación con el grado de diferenciación histológica del tumor, los menos diferenciados tienen menor expresión del antígeno, por tanto, el antígeno H puede ser considerado como un antígeno oncofetal, con expresión en el feto y en el tejido tumoral pero no en el tejido normal, independientemente del grupo ABO.

Resultados similares respecto a la expresión de los isoantígenos ABH en el endometrio encuentra Gupta 1976 (113) que publica una expresión positiva del antígeno H en el adenocarcinoma de endometrio y negativa en el endometrio adulto normal (en tejidos procesados en parafina). En este trabajo no se estudian tejidos fetales.

En este mismo trabajo de Gupta encuentra una negatividad de expresión del antígeno H en el cerebro normal y en astrocitomas, meduloblastomas y ependimomas.

OTROS ANTICUERPOS

IV. 4. 12 ALFA-1-ANTITRIPSINA

El anticuerpo utilizado es la alpha-1-antitripsina de Biogénex. **Características:** La alpha-1-antitripsina es una glicoproteína de 54.000 PM y representa el mayor componente de la alpha-1-globulina en el suero.

Aproximadamente el 90% de la actividad antiproteolítica del suero reside en esta fracción. Probablemente la alpha-1-antitripsina (ATT) funciona como la proteína de mayor control contra la actividad enzimática, tanto endógena como exógena contra los tejidos (232).

Localización: Se encuentran en los fluidos corporales, linfa, moco, saliva, líquido sinovial, secreciones gastrointestinales, semen, líquido amniótico y calostro (232).

Se ha encontrado tanto en el riñón fetal como en el adulto en los túbulos proximales y en el mesénquima primitivo fetal, marcando el citoplasma celular(86). Con la diferenciación de las células mesenquimales se pierde la expresión de esta glicoproteína en el riñón adulto.

Se ha utilizado también la alpha-1-antitripsina como marcador de macrófagos (131).

Experiencia con ATT (Alfa- 1- antitripsina):

Se ha descrito el alfa-1-antitripsina en diferentes neoplasias:

- 1) Carcinoma hepatocelular.
- 2) Tumor del seno endodérmico (86).
- 3) Tumores mixtos mesodérmicos del ovario (72).
- 4) Carcinoma gástrico (86).

- 5) Carcinoma de pulmón (86).
- 6) Tumores renales (86).
- 7) Small Cells tumors (239).

Ulbright 1987 encuentra positividad para la alpha-1-antitripsina en estos tumores junto con la expresión de citokeratina y vimentina.

- 8) Tumores ováricos de células germinales. (Aparece en una minoría de los tumores) Teratomas ováricos.

(En la diferenciación en epitelio glandular).

Coriocarcinoma y tumor del saco vitelino expresan con más frecuencia la alpha-1-antitripsina que los carcinomas embrionarios, seminomas y disgerminomas (182).

IV. 4. 13 ALFA FETO PROTEÍNA

Se ha utilizado la alfa feto proteína de Biogenes, Histogen PAP HP08-5c.

Fuente: El anticuerpo se obtiene por inmunización en conejo con AFP.

Características:

- Es la alfa feto proteína es un antígeno embrionario de PM (64.000), y es al mismo tiempo un marcador tumoral.

Se produce en el hígado fetal, en el saco vitelino y en algunos tumores de células germinales de testículo y ovario.

TABLA IV. 4.13. 1

LOCALIZACIÓN TISULAR DE LA ALFA FETO PROTEÍNA EN TUMORES MALIGNOS DE CÉLULAS GERMINALES

	Tipo de Tumor	Porcentaje de positividad
TESTICULO	Seminoma	0%
	Teratoma	0%
	Carcinoma Embrionario	47%
	Tumor del seno endodérmico	50%
	Coriocarcinoma	0%
OVARIO	Digerminoma	0%
	Teratoma inmaduro	0%
	Carcinoma Embrionario	70%
	Tumor del seno endodérmico	100%
	Coriocarcinoma	0%

Tomado de información de casa comercial (Biogenex).

También aparece en hepatomas y ocasionalmente en hepatitis hepáticas.

El 70% de los carcinomas embrionarios y el 100% de los tumores del seno endodérmico presentan reacción positiva con este anticuerpo. Kurman 1981 (151), (149) y (150) y (152).

En las preparaciones la distribución del antígeno aparece de forma heterogénea. Niehans encuentra la alfa feto proteína positiva en 74% de los tumores del seno endodérmico y en el 33% de los carcinomas embrionarios (182).

- Los estudios inmunohistoquímicos han venido a apoyar las observaciones ya realizadas por estudios morfológicos por Telium 1965 (235), que los diferenció de los tumores de células claras con los que originariamente estaban mezclados.

- El tumor de células claras del tracto genital femenino y el tumor del seno endodérmico son tumores histológicamente similares con diferente evolución y tratamiento, dadas sus características histológicamente similares ambos tumores fueron originalmente

clasificados por Schiller (referencia tomada de Zirker (260)) como mesonefomas; dado que él pensó que ambos tumores derivaban de conductos mesonéfricos remanentes. Más tarde Telium (235) demuestra el origen en células germinales del tumor del seno endodérmico. Scully y Barlow (209) la naturaleza Müllleriana del carcinoma de células claras.

Aunque estos tumores pueden ser separados con parámetros clínicos e histológicos, existen algunos casos equívocos.

La diferenciación de estos dos tumores puede basarse en la presencia de AFP en el suero en pacientes con tumor del seno endodérmico. Pero la demostración de AFP en el suero en pacientes con diferentes tumores ováricos (123), (42) y la ausencia de AFP en algunos tumores del seno endodérmico indican la necesidad de marcadores adicionales.

Zirker (260) utiliza el Leu-M1, junto con la AFP para el diagnóstico diferencial entre estos dos tumores. El Leu-M1, que primariamente es un antígeno mielomonocítico parece ser un marcador útil en el diagnóstico diferencial entre carcinoma y otros tumores.

Casper (42) publican su localización con técnicas de inmunohistoquímica en las células tumorales en el 7% de los carcinomas epiteliales ováricos y Higuchi encuentra también AFP positiva en cistoadenocarcinoma seroso papilar.

También refiere este autor no encontrar expresión de la AFP en el ovario adulto normal.

El mecanismo de producción de la AFP para tumores ováricos que no tienen su origen en células germinales no está claro.

Zirker 1989 (260), publica la utilidad del Leu-M1 y la AFP en el diagnóstico diferencial entre el carcinoma de células claras y el tumor del seno endodérmico.

Encuentra este autor que una inmunotinción positiva para la AFP y negativa para el Leu-M1 apoyaría el diagnóstico de tumor del seno endodérmico y que una inmunotinción positiva para el Leu-M1 y negativa para la AFP apoya el diagnóstico de tumor de células claras.

También concluye en este trabajo que si ambos marcadores son positivos o negativos no tienen valor diagnóstico.

Telium sugirió el término "tumor del seno endodérmico" por la similitud en la estructura de estas neoplasias y el saco endodérmico del saco vitelino en ratas.

- Gitlin 1972 (105) demostró la producción de alfa feto proteína en el saco vitelino y posteriormente Kurman 1976 (149) demuestra con técnicas inmunohistoquímicas que los patrones en tumores del seno endodérmico son similares a los del endodermo del saco vitelino. Observaciones similares las realizó Nogales 1977 (183). Estos hallazgos vinieron a corroborar lo publicado por Telium sobre la histogénesis del tumor del seno endodérmico.

En la siguiente tabla se presentan los resultados con determinaciones de HCG y alfa-feto-proteína, de gran utilidad para el diagnóstico diferencial entre diferentes tumores de células germinales.

TABLA IV.4. 13.2

DEMOSTRACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE HCG Y AFP EN TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES

Tumor	HCG	AFP
Seminoma	--	--
Seminoma *	+	--
Carcinoma Embrionario	+	+
Tumor del seno endodérmico	--	+
Coriocarcinoma	+	--
Teratoma **	--	--

* Células gigantes de Syntioctrofoblasto.

** Raramente se encuentran en este tumor tinciones positivas de HCG

- Kurman (152) encuentra una relación entre los tumores de células germinales y los patrones de expresión de HCG y AFP; encuentra en carcinoma embrionario adulto asociado frecuentemente

a expresión positiva en las inmunotinciones de AFP y HCG; encuentra también, la expresión positiva del AFP en los tumores del seno endodérmico y la expresión positiva del HCG en el coriocarcinoma.

Resultados similares los publica Bast (17).

- Stamp (221) publica la negatividad de la expresión del AFP en el tumor de células juveniles de la granulosa junto con la expresión también negativa del CEA, HCG, HMFG1 y HMFG2, en estos tumores encuentra por el contrario una expresión positiva para la vimentina. La tinción positiva para la vimentina en el tumor de células juveniles de la granulosa es menos intensa que en los tumores derivados de la teca.

- Se ha estudiado la expresión del AFP tanto en el urotelio normal como neoplásico, así como en el tumor de Brenner. En estos tres casos la expresión del AFP fué negativa (203).

Preparación de los tejidos: El anticuerpo se puede utilizar tanto en tejidos embebidos en parafina como en tejidos en congelación.

IV. 4. 14 Ki 67 (MONOCLONAL MOUSE ANTIHUMAN PROLIFERATING CELLS)

Se ha utilizado en el trabajo el Ki 67 de Daco.

Antígeno: El Ki 67 es un anticuerpo monoclonal que reacciona con un antígeno nuclear humano presente en todas las células en proliferación, es decir en las fases G1, S1, G2 y M del ciclo. Se encuentra ausente en las células quiescentes y también las células en fase G0 (Gerdes 1984) (101).

Características del anticuerpo: Es una IgG1 Kappa.

Presentación: Sobrenadante de cultivos celulares (RPM1 1640 medium, conteniendo suero de feto de vaca, diluido en 0,05M, tris-HCl, pH 7.2, 15mM NaN3).

Preparación de los tejidos: No es válido este anticuerpo para ser utilizado en tejidos en parafina.

Se debe utilizar en tejidos en congelación y en una dilución al menos 1:10 en cortes en congelación fijados en acetona.

Reacción en distintos tejidos:

- Varios estudios reportan una gran correlación entre la proporción de K1 67 y la clasificación histológica en linfomas malignos no-Hodking (202), en tumores de mama (100) y (166) y en tumores de pulmón (98).
- En el timo la mayoría de los timorцитos son teñidos, sólo ocasionalmente aparece alguna célula teñida en la médula.
- En el tracto gastrointestinal reacciona con las células epiteliales de la mucosa, en los cilios o en regiones vasales mientras que las células más superficiales son negativas.
- En el epitelio escamoso tiñe preferentemente los núcleos de células basales, aunque tiñe también el citoplasma en estas células (Gerdes 1983) (102).

TABLA IV.4. 14. 1

EXPRESIÓN DEL K1. 67 EN DIFERENTES TEJIDOS

ÓRGANO	TIPO CELULAR	REACCIÓN NUCLEAR
Amígdala	Centroblastos	+++1
	Centrocitos	+
	Follicular mantle cells	-/+
Timo	Timocitos corticales	+++
	Timocitos medulares	-
Mucosa oral	Células basales	+2
	Células superficiales	-
Riñón	Células tubulares	-
	Células glomerulares	-
Hígado	Hepatocitos	-
	Células de Knopfer	-
Estómago	Células superficiales epiteliales	-
	Células glandulares	+
	Células parietales	-
Testículo	Espermatogonia indiferenciada	+
	Espermatozoide	-
	Células de Leydig	-
Cerebro	Todas las células	-

+++1 = más de 40% de células positivas

++ = 20% de células positivas

1 = 10% de células positivas

-/+ = 2% de células positivas

- = negativo

2 = estas células muestran también tinción citoplásmica

Referencia tomada de Gerdes 1982 (102).

-En la búsqueda bibliográfica realizada sólo se han encontrado dos trabajos que estudian el K1 67 en tumores ováricos o del tracto genital femenino. Brown et al en 1988 (34) publica un trabajo con K1 67 en el Ca. de cervix y Wong 1989 (254) publica otro trabajo con el K1 67 en el Ca de ovario.

Aplicación clínica: Este anticuerpo se ha utilizado para estimar la fracción de crecimiento "Growth fraction", es decir la proporción de células proliferativas en un tumor (206).

Mendelsohn 1962 define la fracción de crecimiento (GF) como la relación entre el número de células proliferativas (P) y el número total de células(Q).

Wong en el ovario(254), Gerdes 1986 en la mama (100) y Gatter 1986 en el pulmón (98) encuentran una buena correlación entre el grado histológico del tumor y las inmunotinciones con K1 67 (GF), encontrando un mayor número de células positivas al K1 67 en tumores pobremente diferenciados.

Estos hallazgos están en contra de lo publicado por Brown 1988 (207) en el Ca de cérvix.

Wong (254) encuentra resultados similares con el K1 67 en los tumores primarios y en las metástasis adyacentes, pero encuentran una mayor fracción de crecimiento en las metástasis a distancia. Publica también una supervivencia acortada cuando la fracción de crecimiento es mayor en el tumor.

IV. 4. 15 URO 1, URO 5, URO 8 Y URO 10

Estos anticuerpos utilizados en el trabajo los provee el laboratorio "Cambridge Research Laboratory".

Características de los anticuerpos:

En la tabla siguiente resumimos las características de los anticuerpos utilizados en el trabajo.

IV. 4. 15. 1

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS URO

Designación	Clono	Ig subclase	Cultivos celulares utilizados para la inmunización	Antígeno (a)
URO 1	J143	IgG 1	253 J vejiga	140/120/30 Kd. GP*
URO 5	T16	IgG 2b	T24 vejiga	48/42 Kd. GP*
URO 8	F31	IgM	SK-RC-1 renal	GP estable al calor
URO 10	T43	IgG1	T24 vejiga	85 Kd. GP*

(a) = antígeno inmunoprecipitado de (3H) glucosamina-lizado de células bajo condiciones de reducción.

Preparación de los tejidos: Estos anticuerpo se pueden utilizar sólo en tejidos en congelación, no son válidos en preparaciones en parafina.

Tejidos que expresan estos anticuerpos:

1) Riñón normal y urotelio. En la tabla siguiente se resumen las localizaciones de estos antígenos en el riñón normal y en el urotelio.

TABLA IV. 4. 15. 2

EXPRESIÓN DE LOS UROS EN TEJIDO RENAL Y UROTELIO

Anticuerpo	Glomérulo	Túbulo proximal	Asa de Henle	Túbulo Distal	Túbulo Colector Urotelio
URO 1 (b)	*****				*****
URO 5				*****	
URO 8			*****		
URO 10		*****			

(b) = tinción de la membrana basal y de las células basales.

Datos tomados de la información comercial de los UROS (Cambridge Research Laboratory).

2) El URO 1 tiñe la membrana basal en el esófago, la piel, el urotelio y el glomérulo y de forma heterogénea la matriz intersticial en fetos y adultos.

3) El URO 5 tiñe de forma positiva la mama adulta y el cérvix adulto y fetal así como el esófago y la piel.

A continuación expondremos en la Tabla VI. 4. 15. 3 los datos publicados por Cordon Cardo en 1984 (52) realizando inmunotinciones con los anticuerpos uroteliales y renales en diferentes órganos en tejidos adultos y fetales.

TABLA IV.4. 15. 3

DISTRIBUCION DE LOS URO EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS EN DIFERENTES ORGANOS

Tejidos normales	URO - 1		URO - 5	
	Feto	Adulto	Feto	Adulto
Riñón				
Glomérulo	+/-	+/-	--	--
Túbulo proximal	--	--	--	--
Asa de Henle		--		+/-
Túbulo distal	--	--	+	+
Túbulo colector	--	--	+	+
Urotelio	+/-	+/-	+	+
Mama		--		+
Ovario	--	--	--	--
Utero	--	--	--	--
Cérvix	--	--	+	+
Trofoblasto	--	--	--	--
Pulmón	--	--	--	--
Esófago	+/-	+/-	+	+
Estómago	--	--	--	--
Colon	--	--	--	--
Piel	+/-	+/-	+	+
Cerebro	--	--	--	--
Adrenal	--	--	--	--
Tiroides		+		--
Nódulo linfático	--	--	--	--
Músculo liso y estriado	--	--	--	--
Células endoteliales	--	--	--	--
Fibroblasto	--	--	--	--
Secreción extracelular	--	--	--	--

Referencia de Cordón Cardo 1984 (52).

4) Carcinoma renal aparece con tinciones positivas para el URO 2, el URO 4 y el URO 3 (236).

5) El URO 3 tiñe el tumor de mama.

6) El adenocarcinoma mesonéfrico de vejiga aparece con tinciones positivas para el URO 2 y el URO 4.

7) Los leiomiomas uterinos presentan tinción positiva para el URO 3 y el URO 4 (236).

8) Tomsewski sugiere en su trabajo (236) que los URO-2-3-4 pueden ser utilizados como marcadores tumorales para carcinoma renal, pero con baja especificidad. Una reacción negativa utilizando un panel de estos anticuerpos uroteliales puede servir para excluir el origen real de un carcinoma de origen desconocido.

Utilidad clínica: Estos anticuerpos se han utilizado hasta el momento a nivel de investigación:

1) Para el estudio de la embriogénesis del riñón humano, pudiendo utilizarse para el estudio de la patogénesis en las malformaciones renales (52).

El tracto urinario embriológicamente deriva del mesodermo y de la cloaca.

La nefrogénesis resulta de la condensación del mesenquima metanéfrico alrededor de las ampollas del uréter.

La diferenciación metanefrogénica produce las estructura glomerulares y tubulares del sistema de filtro renal y los túbulos colectores, (66).

Los fenotipos antigénicos encontrados con anticuerpos monoclonales en las diferentes células de la nefrona humana y del urotelio se corresponden con este perfil de maduración.

2) Las diferentes investigaciones realizadas con estos anticuerpos abre un campo para su posible utilización como marcadores tumorales de células de origen renal y vesical.

Tomaszewski(236) el autor sugiere que la utilización de un panel con estos anticuerpos puede ser útil para

descartar el origen renal en caso de estudio de una metástasis de tumor primario desconocido, dado que si encontráramos todas las inmunotinciones negativas para estos anticuerpos uroteliales y renales se podría descartar el origen renal o vesical del tumor primario.

CAPITULO V

MATERIAL Y MÉTODO

V. 1

MATERIAL

V. 1. MATERIAL

Dado que la finalidad de este trabajo es realizar un estudio evolutivo de diferentes antígenos, se han utilizado tejidos fetales, tejidos adultos sanos y tumores epiteliales ováricos, para realizar un análisis comparativo entre ellos.

Las técnicas han sido realizadas en tejidos en parafina y en tejidos en congelación para poder comparar la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales en ambos tipos de conservación de tejidos.

Se han utilizado:

- a) tejidos fetales en parafina: útero, ovarios y trompas.
- b) tejidos fetales en congelación: útero, ovario, trompas, uréteres y riñones.

Para ambas técnicas de conservación de tejidos se han empleado fetos entre la 17 y la 21 semana.

No se han utilizado riñones ni uréteres fetales en parafina ya que los anticuerpos empleados para el estudio de estos tejidos han sido los anticuerpos monoclonales URO que precisan de tejidos en congelación, no pudiéndose emplear en tejidos en parafina.

- c) tejidos adultos sanos en parafina: Se ha realizado el estudio en ovario, trompa, cérvix y endometrio.
- d) tejidos adultos sanos en congelación: Se ha realizado el estudio en ovarios sanos conservados en congelación.
- e) Tumores epiteliales ováricos: Para el estudio se han utilizado muestras de dichos tumores conservados en parafina. Para la confirmación del diagnóstico anatopopatológico se han empleado tinciones de hematoxilina-eosina.

- f) Adenocarcinoma endometrial: Se han utilizado muestras de dicho tumor en parafina.

V.1.1 FUENTE DE OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS

Los tejidos normales de adulto sano han sido obtenidos de especímenes de piezas quirúrgicas, fijadas en formol e incluidas en parafina.

En el caso de tejido adulto sano para congelación las piezas fueron inmersas en nitrógeno líquido inmediatamente a su obtención y conservadas a -70°C .

El material fetal, tanto aparato genital interno como riñón y uréter, procede de donaciones que se efectúan al departamento de Ciencias Morfológicas (Profesor Puerta).

Los fetos utilizados correspondían a una edad gestacional entre la 17 y 22 sem. La edad de gestación ha sido obtenida por medición del CRL y DBP. Los tejidos se encontraban bien preservados en el momento de la obtención de los mismos. Los tejidos frescos fueron fijados en formol al 10 %, tras la disección anatómica y embebidos en parafina.

Los tejidos fetales utilizados en congelación fueron, tras la disección anatómica embebidos en OCT e inmersos en nitrógeno líquido y conservados a -70°C , hasta su utilización.

Para el trabajo han sido utilizados 12 fetos, de los cuales 6 han sido utilizados para las técnicas en parafina y 6 para las técnicas en congelación.

Las preparaciones de tumores epiteliales ováricos y adenocarcinoma endometrial provienen de la histioteca del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Guadalajara.

Se han utilizado un total de nueve casos de tumores epiteliales ováricos y un adenocarcinoma endometrial.

Se han realizado inmunotinciones en todos los tipos de tumores epiteliales ováricos, tumor de Celulas Claras,

endometriode, adenocarcinoma Seroso, adenocarcinoma Mucinoso y Tumor de Brenner.

V.1. 2. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS UTILIZADOS

1) Se utilizaron para inclusión en parafina los siguientes casos de tejido fetal:

Caso 1 (21 sem.) Caso 2 (17 sem.) Caso 3 (18 sem)
Caso 4 (22 sem.) Caso 5 (18 sem) Caso 6 (21 sem).

En cada uno de los casos se estudiaron el útero ,los dos ovarios y las dos trompas.

Se han realizado inmunotinciones con doce anticuerpos monoclonales en cada uno de los casos.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

EMA, CAM 5.2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki. 67 y ALFA-FETOPROTEINA.

2) Se utilizaron para técnicas en congelación los siguientes casos de tejido fetal:

Caso 7 (22 sem.) Caso 8 (19 sem.) Caso 9 (20 sem.) Caso 10 (20 sem) Caso 11 (21 sem.) Caso 12 (19 sem).

En cada uno de los casos se estudiaron el útero, los dos ovarios y las dos trompas.

En cada uno de los casos enumerados se han realizado inmunotinciones con dieciseis anticuerpos monoclonales.

En los casos 8 y 9 se disecaron ambos riñones fetales y los uréteres.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

* EMA, CAM 5. 2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki.67 y ALFA-FETOPROTEINA y URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10.

* URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10. En los casos 8 y 9 en uréteres y riñones.

3) Tumores epiteliales ováricos en parafina:

Las preparaciones de tumores epiteliales ováricos y adenocarcinoma endometrial provienen de la histioteca del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Guadalajara.

Se han utilizado un total de doce casos de tumores epiteliales ováricos y un adenocarcinoma endometrial.

Se han realizado inmunotinciones en todos los tipos de tumores epiteliales ováricos, tumor de Células Claras, endometriode, adenocarcinoma Seroso, adenocarcinoma Mucinoso y Tumor de Brenner.

Tumor de Células Claras: Caso 16 y 27.

Adenocarcinoma Endometriode: Casos 17, 19 y 25.

Tumor de Brenner: Casos 20 y 23.

Adenocarcinoma Seroso: Casos 21, 22 y 30.

Adenocarcinoma Mucinoso: Casos 24 y 26.

Adenocarcinoma de endometrio: Caso 18.

En cada uno de los trece casos de tumores se han realizado inmunotinciones con doce anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

EMA, CAM 5.2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki. 67 y ALFA-FETOPROTEINA.

4) Tejidos adultos en congelación:

Se han utilizado dos casos ,estudiando lo ovarios obtenidos de dos histerectomías con doble anexectomía por útero miomatoso.

Caso 13 y Caso 14.

En cada uno de los dos casos se han realizado inmunotinciones con quince anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

EMA, CAM 5.2., PKK.1, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki.67, ALFA-FETOPROTEINA y URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10.

5)Tejidos adultos en parafina:

Se han utilizado los siguientes casos:

trompa normal. Casos : 15, 16, 20 y 28.

endometrio normal. Caso 18.

cervix normal. Caso 18.

ovario normal. Casos 17, 20, 28 y 29.

Obtenidos de piezas de intervenciones quirúrgicas, histerectomía con doble anexectomía tumores ováricos, tras la confirmación anatomopatológica de tejido normal.

En cada uno de los casos se han realizado inmunotinciones con doce anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

EMA, CAM 5.2., PKK.1, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki.67, ALFA-FETOPROTEINA y AE1/AE3.

6)Adenocarcinoma de endometrio:

En este caso de adenocarcinoma de endometrio se han realizado inmunotinciones con doce anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

EMA, CAM 5.2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW) , Ki.67 y ALFA-FETOPROTEINA. Dada la importancia de una buena conservación de los tejidos para estudios con anticuerpos monoclonales se han seleccionado los casos para que el estado de conservación y fijación de los tejidos fuera óptimo.

Para la utilización del material fetal, donado al Departamento de Ciencias Morfológicas (Profesor Puerta) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, se obtuvo permiso del Director General del Insalud, de la Dirección del Hospital de Móstoles y del Jefe de Servicio de Ginecología de dicho centro, así como de la paciente.

181

V.2

METODO

V. 2 . MÉTODO

TÉCNICAS PARA ANTICUERPOS MONOCLONALES
UTILIZADAS EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL

V. 2.1) RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS

V. 2.2) TÉCNICAS PARA LA INMUNOTINCIÓN CON ANTICUERPOS
MONOCLONALES EN TEJIDOS EN PARAFINA (PAP).

V. 2.3) TÉCNICAS PARA LA INMUNOTINCIÓN CON ANTICUERPOS
MONOCLONALES EN TEJIDOS EN CONGELACIÓN (PAP).

V. 2.4) DILUCIÓN DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS.

V. 2.5) FORMULACIÓN DE REACTIVOS.

V. 2.6) TÉCNICAS DE CONTROL DE LAS INMUNOTINCIONES.

INTRODUCCIÓN:

Describiremos a continuación la metodología utilizada en el presente trabajo para la realización de la técnica de PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA. El esquema básico de trabajo es una modificación de las técnicas empleadas por otros autores (21), (188) y de las aconsejadas por las casas comerciales proveedoras de los anticuerpos utilizados.

La técnica básica para las inmunotinciones con anticuerpos monoclonales ha sido ya descrita en el Capítulo IV.3. "Técnicas de inmunohistoquímica. Anticuerpos monoclonales."

Dichas modificaciones son el fruto de la experiencia en este tipo de técnicas del laboratorio donde han sido realizadas las mismas (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Guadalajara).

Las diluciones de los anticuerpos que se han empleado, son las que tras diferentes pruebas han conseguido las mejores tinciones.

Los tiempos de incubación con los anticuerpos se han reducido tras comprobar que los resultados eran idénticos que cuando se empleaban períodos de incubación de 12 o 24 horas.

V. 2.1. RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS:

A) Tipos de anticuerpos utilizados :

TABLA V.2.1.

ANTICUERPOS UTILIZADOS (I)

- Filamentos intermedios:
(Citokeratinas)
 - AE1/AE3
 - PKK1
 - CAM 5.2
- Otros filamentos intermedios:
 - DESMINA
 - VIMENTINA
- Antígenos tisulares asociados:
 - EMA
 - FACTOR VIII
 - ANTIGENO H
DEL GRUPO
SANGUINEO
 - S-100
- Antígenos uroteliales
y renales:
 - URO-1
 - URO-5
 - URO-8
 - URO-10
- Otros antígenos:
 - ALFA-1-ANTITRIPSINA
 - ALFA-FETOPROTEINA
 - Ki-67

B) Pasaremos a describir las características de los anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio. En el Capítulo "Panel de anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio" se ha expuesto de forma amplia las características de cada uno de dichos anticuerpos, junto con una amplia revisión bibliográfica de cada uno de ellos.

Se han utilizado anticuerpos monoclonales dada su mayor especificidad en su unión con los antígenos buscados, frente a la menor especificidad si se emplean anticuerpos policlonales.

Relación de las casas comerciales proveedoras de los anticuerpos utilizados, del antígeno que identifican y la dilución a la que se han utilizado los anticuerpos :

- 1.- EMA: ANTI-HUMAN EPITHELIAL MEMBRANE ANTIGEN
 Proveedor: DAKOPATTS, Dinamarca.
 Antígeno: Antígeno epitelial de membrana.
 Dilución: 10/ 750.
- 2.- CAM.5.2: ANTI-CITOKERATINA HUMANA.
 Proveedor: BECTON DICKINSON, Inc Mountain View, CA.
 Antígeno: Citokeratinas humanas de 50-kD, 43-KD 39k-D (no. 8, 18 y 19 de la clasificación de Moll).
 Dilución: 10/ 250.
- 3.- PKK1: ANTICITOKERATINA. (DE CERDO)
 Proveedor: LABSYSTEMS, Helsinki, Finlandia.
 Antígeno: Citokeratinas de 40 k-D y 68k-D.
 Dilución: 10/1000.
- 4.- AE1/AE3: ANTICITOKERATINA HUMANA
 Proveedor: HYBRITECH Inc. San Diego CA.
 Antígeno: Citokeratinas 50.56, 5.58, 65-67 kD.
 Dilución: 10/1000.
- 5.- VIMENTINA: ANTIVIMENTINA (DE CERDO)
 Proveedor: LABSYSTEMS, Helsinki, Finlandia.
 Antígeno: Vimentina, 58-kD filamento intermedio.

- Dilución: 10/1000.
- 6.- DESMINA: ANTIDESMINA (DE RATON).
Proveedor: BIO-YEDA, Israel.
Antígeno: Antidesmina, 50, 55k-D filamento intermedio.
Dilución: 10/500.
- 7.- S-100: ANTI S-100 DE VACA EN CONEJO.
Proveedor: DAKOPATTS, Dinamarca.
Antígeno: S-100 A y B de vaca.
Dilución: 10/2000.
- 8.- AFP: ALFA- FETOPROTEINA.
Proveedor: BIOGENEX LAB., Dublin.
Antígeno: alfa-fetoproteína (64.000 PM)
Dilución: 10/500.
- 9.- B.G.A. H: ANTI H (ANTIGENO DE GRUPO SANGUINEO).
Proveedor: LIPSHAW, Detroit.
Antígeno: Trisacarido a-L-fucosa (1-2) b-D-galactosa (1-4)-b-D-N-acetil glucosamina, sintético.
Dilución: 10/500.
- 10.- AAT: ALFA-1 ANTITRIPSINA.
Proveedor: BIOGENEX, Dublin.
Antígeno: AAT Glicoproteína de (54000 PM).
Dilución : 10/500.
- 11.- FVW: ANTI FACTOR VON WILLEBRAND HUMANO.
Proveedor: DAKOPPATS, Dinamarca.
Antígeno: Factor Von Willebrand aislado de plasma humano.
Dilución: 10/2000.
- 12.- Ki-67: ANTI-ANTIGENO DE PROLIFERACION CELULAR(Ki-67).
Proveedor: DAKOPPATS, Dinamarca.
Antígeno: Antígeno humano de proliferación celular.
Dilución: 10/100.

- 13.- URO-1: ANTIGLICOPROTEINA UROTELIAL HUMANA.
 Proveedor: CRL (Cambridge Research Laboratory)
 Antígeno: 140, 120, 30-kD glicoproteína
 (Cultivo c. vesicales)
 Dilución: 10/ 500.
- 14.- URO-5: ANTIGLICOPROTEINA UROTELIAL HUMANA.
 Proveedor: CRL (Cambridge Research Laboratory)
 Antígeno: 48, 42-kD glicoproteína (Cultivo c.
 vesicales)
 Dilución: 10/500.
- 15.- URO-8: ANTIGLICOPROTEINA RENAL HUMANA.
 Proveedor: CRL (Cambridge Research Laboratory)
 Antígeno: Glicoproteína estable al calor
 (Cultivo c. renales)
 Dilución: 10/500.
- 16.- URO-10: ANTIGLICOPROTEINA UROTELIAL HUMANA.
 Proveedor: CRL (Cambridge Research Laboratory)
 Antígeno: 85-kD glicoproteína (Cultivo c.
 vesicales)
 Dilución: 10/500.

V.2.2. TÉCNICA PARA INMUNOTINCIÓN CON ANTICUERPOS MONOCLONALES EN TEJIDOS EN PARAFINA.

En todos los casos de tejidos embebidos en parafina descritos anteriormente se han realizado inmunotinciones con los doce primeros anticuerpos descritos en el apartado anterior :

- EMA. CAM 5.2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki.67 y ALFA-FETOPROTEINA.

Los anticuerpos monoclonales URO solo se han utilizado en tejidos en congelación puesto que no pueden ser empleados en tejidos en parafina.

La técnica empleada para las inmunotinciones ha sido la misma para todos los anticuerpos monoclonales en tejidos en parafina, empleando en cada caso el anticuero correspondiente a la dilución expuesta en la Tabla V. 2. 2.

Pasaremos a continuación a describir la metodología de la técnica utilizada.

Con los tejidos una vez disecados se fijaban en formol al 10% en un período de 2 a 24 h .según los casos. se procedió a embeberlos en bloques de parafina conservándolos hasta su utilización .

La técnica precisa de unas 8 horas para su realización.

Pasos a seguir:

1.- DESPARAFINAR :

-Con Xilol 30 min (Dos periodos de 15 min.)

Se procede a desparafinar la preparación en parafina mediante inmersión Xilol, en cubeta con dos inmersiones de 15 minutos cada una.

2.- HIDRATACION PROGRESIVA :

- Alcohol absoluto-lavar.

- Alcohol absoluto-lavar

- Alcohol de 96 ° -lavar (Dos lavados).

La hidratación se realiza con pasos sucesivos en alcohol absoluto y alcohol de 96°.

Se tienen preparadas cuatro cubetas, las dos primeras con alcohol absoluto y dos con alcohol de 96°. Se procede a realizar cinco pases (Introducir en la cubeta y sacar) con cada preparación en las dos primeras cubetas con alcohol absoluto y dos pases en las cubetas con alcohol de 96°.

3.- BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDOGENA :

- Inmersión en Methanol más Agua Oxigenada H₂O₂, 15 min.

La solución para realizar el bloqueo de la peroxidasa endógena se realiza con:

(100cc Methanol +1.5 ml de H₂O₂).

La preparación se mantiene en inmersión en una cubeta con la solución anteriormente descrita durante 15 minutos.

4.- LAVAR en grifo 5 min :

- Tras el bloqueo de la peroxidasa endógena se procede a lavar la preparación en agua corriente bajo el grifo durante un periodo de 5 minutos.

5.- TRIPSINIZACIÓN :

- Tras el lavado en agua corriente se procede a la tripsinización.

En este trabajo se ha utilizado la Tripsina de "Chemical Company Sigma". Se trata de una Tripsina de pancreas porcino tipo II.

Para realizar la tripsinización se procede con los siguientes pasos:

- Lavar en H₂O destilada a 37°C durante 5 min

Este lavado se realiza mediante inmersión en cubeta.

- Inmersión en Tripsina a 37°C durante 30 min.

La inmersión se realiza en una preparación realizada con: (Cl₂ Ca 0.1%, 200ml+Tripsina 0.2 g a pH 7.6). El pH inicial de la preparación con cloruro cálcico y tripsina tiene un pH de 5, que se corrige con hidróxido sódico 0.1 normal, (HONa 0.1N), precisándose para ajustar el pH hasta 7.6 de 100 ml de solución de cloruro cálcico y tripsina unas 17 gotas de OHNa 0.1 N.

- Lavar en grifo durante 4 min.
- Dos lavados en Buffer TRIS de 5min.

Los dos lavados con el Buffer TRIS se realizan en barras paralelas, empleándose en cada uno de los lavados 5min.

6.- Inmersión en SUERO DE CERDO :

Se mantiene la preparación en inmersión durante 15 minutos en una solución preparada con :

(Buffer Tris 100ml + Suero de cerdo, 200 landas).

7.- LAVADOS :

- Dos lavados en Buffer TRIS de 5 min.

Se realizan dos lavados con Buffer TRIS ,en paralelas, de 5 minutos cada uno.

8.- ANTICUERPO PRIMARIO ESPECÍFICO :

En este paso se han ido utilizando cada uno de los doce anticuerpos monoclonales empleados para este estudio :

- EMA, CAM 5.2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), K1.67 y ALFA-FETOPROTEINA.

Cada anticuerpo se ha utilizado en la dilución descrita en la Tabla V. 2. 2.

Se utilizan 250 landas del anticuerpo diluido.

Se incuba durante 1 h. la preparación con el anticuerpo primario en cámara húmeda .

Para realizar esta incubación en cámara húmeda se introduce la preparacion en una "Cápsula de Petri" con algodón húmedo.

9.- LAVADOS :

Se realizan dos lavados sucesivos, en paralelas, de cinco minutos cada uno con Buffer TRIS.

10.- 1º ANTICUERPO "PUENTE" :

Incubación 30min en " Peroxidase- Conjugated Rabbit Anti-Mouse Inmunoglobulins" (De DAKOPATTS).

Se cubre la preparacion con unas gotas de la siguiente solución:

100 landas del anticuerpo puente +1cc de Buffer TRIS +0.5 cc de suero humano (Cantidad para utilizar en 15 preparaciones).

La incubación se realiza en cámara húmeda. Para la incubación se han utilizado una "Cápsula de Petri " con un algodón húmedo.

11.- LAVADOS :

Se realizan dos lavados sucesivos, en barras paralelas, de cinco minutos cada uno con Buffer TRIS.

Tras el lavado secar con papel alrededor de la preparación.

12.- 2º ANTICUERPO "PUENTE" :

Incubación 30 min en "Peroxidase-Congugated Swine Anti-Rabbit Inmonoglobulins"(De DAKPATTS).

13.- LAVADOS :

Se realizan dos lavados sucesivos, en barras paralelas, de cinco minutos cada uno con Buffer TRIS.

14.- REVELADO DE LA PEROXIDASA :

CON DIAMINOBENCIDINA.

Para el revelado de la peroxidasa se pueden utilizar diferentes cromógenos, como ya se ha descrito en el capítulo de "Técnicas de inmunohistoquímica", entre los que se encuentran la DAB (3,3'Diaminobencidina 4HCl), el AEC (3 Amino - 9 Eticarbazol), el HAKER-YATES (pirocatecol - p - fenilendiamina) .

En este trabajo se ha utilizado la Diaminobencidina para el revelado de la Peroxidasa.

La solución con la diaminobencidina se ha preparado el mismo día de la realización de la técnica.

Solución:

- Diaminobencidina	- - - - -	15mg.
- Tris 0.2 molar	- - - - -	6ml.
- ClH 0.1 Normal	- - - - -	9.5ml.
- H2O destilada	- - - - -	9.5 ml.

(El pH se ajusta con NaOH 0.1 normal)

- 500 landas de H2O2.

Se procede a mezclar el TRIS ,el ClH y el H2O destilada en las cantidades indicadas, una vez hecha esta mezcla se ajusta el pH con NaOH 0.1 normal hasta un pH de 7.6.

Una vez ajustado el pH se vierte esta solución sobre la diaminobencidina, y a continuación se añade el el H2O2 .

Para revelar la peroxidasa con la diaminobencidina se cubre la preparación, con pipeta, de la solución previamente preparada, para lo cual se montan las preparaciones en barras paralelas.

Se incuba la preparación con esta solución 5 min a temperatura ambiente.

15.- LAVADO :

Lavar con agua corriente 5 min.

16.- INTENSIFICACIÓN DEL DEPÓSITO CROMÓGENO:

La intensificación del depósito cromógeno se puede realizar con Ac. ósmico al 0.1-1 % o con Sulfato de cobre, utilizando Palacin (188) el sulfato de cobre al 0.5 % . En nuestra técnica utilizamos Sulfato de cobre al 0.2 %. Se introduce la preparación en Sulfato de cobre al 2% en cubeta, 5 min.

17.- LAVADO :

Lavar en cubeta con agua corriente 5 min.

18.- TINCIÓN DE CONTRASTE:

HEMATOXILINA.

La tinción de contraste se puede realizar con Hematoxilina, con Rojo Nuclear, con Verde Metilo con Azul de Metileno o con Verde Luz, segun Palacin (188), autores como DeLellis la realizan con Hematoxilina. En este trabajo se ha utilizado la Hematoxilina como tinción de contraste.

Se introduce la preparación en cubeta durante 3 min con Hematoxilina de Harris (3 partes de Hematoxilina + 1 de H₂O).

19.- DESHIDRATAR :

En tres pasos: -Alcohol 96°
 -Alcohol absoluto.
 -Alcohol absoluto.
 -Xilol (Lavado)
 -Se deja en Xilol hasta el montaje.

La deshidratación se realiza con pasos sucesivos en alcohol de 96° y alcohol absoluto.

Se tienen preparadas cuatro cubetas, las dos primeras con alcohol de 96° y dos con alcohol de absoluto. Se procede a realizar cinco pases (Introducir en la cubeta y

sacar) con cada preparación en las dos primeras cubetas con alcohol de 96° y dos pases en las cubetas con alcohol absoluto.

20.- MONTAJE DE LA PREPARACIÓN :

Con una gota de Eukit, en cristal.

V. 2. 2. 1. TRATAMIENTO ENZIMATICO

El tratamiento enzimático es opcional, pero en el presente trabajo ha sido realizada, en los tejidos en parafina.

El tratamiento enzimático ha sido realizado en este trabajo con TRIPSINA.

En este trabajo se ha utilizado la Tripsina de "Chemical Company Sigma". Se trata de una Tripsina de pancreas porcino tipo II.

V.2.3. TÉCNICA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN TEJIDOS EN CONGELACIÓN.

Los tejidos fueron congelados inmediatamente tras su obtención en nitrógeno líquido, embebidos en OCT y conservados a - 70°C.

Las secciones tisulares (De 4-6 micras) se cortaron usando un criostato " Miles Tissue-Tek II ".

- Una vez cortadas las secciones los cortes se secan al aire de 2'30 h a 2 h.

- Fijación de la preparación con acetona 10 min.

- Una vez fijado en acetona la preparación se puede conservar por tiempo indefinido a -70°C.

Esquema básico para la tinción con Ac monoclonales en tejidos en congelación:

La técnica se realiza en aproximadamente 8 horas, describiremos paso por paso la técnica.

1.- SECAR LA PREPARACIÓN:

A temperatura ambiente durante 30min.

2.- FIJAR :

En acetona durante 10 min.

3.- LAVADOS :

-Dos lavados en Buffer TRIS de 5 min.

Se realizan dos lavados con Buffer TRIS, en barras paralelas, de 5 minutos cada uno.

4.- ANTICUERPO PRIMARIO ESPECÍFICO :

En este paso se han ido utilizando cada uno de los doce anticuerpos monoclonales empleados para este estudio :

- EMA, CAM 5.2., PKK.1, AE1/AE3, VIMENTINA, DESMINA, S-100, BGA H, ANTI-TRIPSINA, FACTOR VIII (FVW), Ki.67 y ALFA-FETOPROTEINA.

Cada anticuerpo se ha utilizado en la dilución descrita en la Tabla V. 2. 2.

Se utilizan 250 landas del anticuerpo diluido.

Se incuba durante 1 h. la preparación con el anticuerpo primario en cámara húmeda .

Para realizar esta incubación en cámara húmeda (se introduce la preparación en una "Cápsula de Petri" con algodón húmedo).

5.- LAVADOS :

Se realizan dos lavados sucesivos, en paralelas, de cinco minutos cada uno con Buffer TRIS.

6.- 1º ANTICUERPO "PUENTE" :

Incubación 30min en " Peroxidase- Conjugated Rabbit Anti-Mouse Inmunoglobulins" (De DAKOPATTS).

Se cubre la preparación con unas gotas de la siguiente solución:

100 landas del anticuerpo puente +1cc de Buffer TRIS +0.5 cc de suero humano (Cantidad para utilizar en 15 preparaciones).

La incubación se realiza en cámara húmeda. Para la incubación se han utilizado una "Cápsula de Petri " con un algodón húmedo.

7.- LAVADOS :

Se realizan dos lavados sucesivos, en paralelas, de cinco minutos cada uno con Buffer TRIS.

Tras el lavado secar con papel alrededor de la preparación.

8.- 2º ANTICUERPO "PUENTE" :

Incubación 30 min en "Peroxidase-Congugated Swine Anti-Rabbit Inmonoglobulins"(De DAKPATTS).

9.- LAVADOS :

Se realizan dos lavados sucesivos, en paralelas, de cinco minutos cada uno con Buffer TRIS.

10.- REVELADO DE LA PEROXIDASA :

CON DIAMINOBENCIDINA.

En este trabajo se ha utilizado la Diaminobencidina para el revelado de la Peroxidasa.

La solución con la diaminobencidina se ha preparado el mismo día de la realización de la técnica.

Solución:

- Diaminobencidina	- - - - -	15mg.
- Tris 0.2 molar	- - - - -	6ml.
- ClH 0.1 Normal	- - - - -	9.5ml.
- H2O destilada	- - - - -	9.5 ml.

(El pH se ajusta con NaOH 0.1 normal)

- 500 landas de H2O2.

Se procede a mezclar el TRIS ,el ClH y el H2O destilada en las cantidades indicadas, una vez hecha esta mezcla se ajusta el pH con NaOH 0.1 normal hasta un pH de 7.6.

Una vez ajustado el pH se vierte esta solución sobre la diaminobencidina, y a continuación se añade el el H2O2 .

Para revelar la peroxidasa con la diaminobencidina se cubre la preparación, con pipeta, de la solución previamente preparada, para lo cual se montan las preparaciones en paralelas.

Se incubó la preparación con esta solución 5 min a temperatura ambiente.

11.- LAVADO :

Lavar con agua corriente 5 min.

12.- INTENSIFICACIÓN DEL DEPÓSITO CROMÓGENO:

La intensificación del depósito cromógeno se puede realizar con Ac. ósmico al 0.1-1 % o con Sulfato de cobre, utilizando Palacin (188) el sulfato de cobre al 0.5 % . En nuestra técnica utilizamos Sulfato de cobre al 0.2 % . Se introduce la preparación en Sulfato de cobre al 2% en cubeta. 5 min.

13.- LAVADO :

Lavar en cubeta con agua corriente 5 min.

14.- TINCIÓN DE CONTRASTE:

HEMATOXILINA.

La tinción de contraste se puede realizar con Hematoxilina, con Rojo Nuclear, con Verde Metilo con Azul de Methileno o con Verde Luz, según Palacin (188), autores como DeLellis la realizan con Hematoxilina. En este trabajo se ha utilizado la Hematoxilina como tinción de contraste.

Se introduce la preparación en cubeta durante 3 min con Hematoxilina de Harris (3 partes de Hematoxilina + 1 de H₂O).

15. - DESHIDRATAR :

En tres pasos:

- Alcohol 96°
- Alcohol absoluto.
- Alcohol absoluto.
- Xilol (Lavado)
- Se deja en Xilol hasta el montaje.

La deshidratación se realiza con pasos sucesivos en alcohol de 96° y alcohol absoluto.

Se tienen preparadas cuatro cubetas, las dos primeras con alcohol de 96° y dos con alcohol de absoluto. Se procede a realizar cinco pases (Introducir en la cubeta y sacar) con cada preparación en las dos primeras cubetas con alcohol de 96° y dos pases en las cubetas con alcohol absoluto.

16.- MONTAJE DE LA PREPARACIÓN :

Con una gota de Eukit, en cristal.

V.2.4 . DILUCIÓN DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS :

En la siguiente Tabla (V.2.2.) presentamos la dilución a la que se han utilizado los diferentes anticuerpos monoclonales que se han empleado en este estudio.

TABLA V.2.2.

ANTICUERPOS UTILIZADOS

Anticuerpo	Proveedor	Antígeno	Dilución
EMA	DAKO	Ep. membrana humana	10/750
CAM 5.2.	B. DICKINSON	CK humana 50-kD, 43-kD, 39-kD	10/250
PKK1	LABSYSTEMS	CK de cerdo 40-kD, 68-kD	10/1.000
AE1/AE3	HYBRITECH	CK humana 50, 56.5, 58, 65-67 kD	10/1.000
VIMENTINA	LABSYSTEMS	Vimentina de cerdo 58-kD	10/1.000
DESMINA	BIO-YEDA	Antidesmina 50, 55-kD	10/500
S-100	DAKO	Anti S-100 A y B de vaca	10/2.000
AFP	BIOGENEX	AFP 64.000 PM	10/500
ALFA-1 ANTITRIPSINA	BIOGENEX	A-1 Antitripsina 54.000 PM	10/500
ANTI FACTOR VIII	DAKO	Factor VIII de plasma humano	10/2.000
ANTI ANTIG. H DE GRUPO SANG.	LIPSHAW	A-L-Fructosa (1-2)-B-D-Galactosa (1-4-) B-D-N-Acetyl-Glucosamina	10/500
K1-67	DAKO	Antígeno humano de proliferación celular	10/100
URO-1	CAMBRIDGE RESEARCH LABORATORY	Cultivo cels. vesicales Glicoproteína 140, 120, 30 kD	10/500
URO-5	CAMBRIDGE RESEARCH LABORATORY	Cultivo cels. vesicales Glicoproteína 48, 42 kD	10/500
URO-8	CAMBRIDGE RESEARCH LABORATORY	Cultivo cels. renales Glicoproteína estable al calor	10/500
URO-10	CAMBRIDGE RESEARCH LABORATORY	Cultivo cels. vesicales Glicoproteína 85 kD	10/500

V.2.5 FORMULACIÓN DE REACTIVOS.

Pasaremos a describir las características de los anticuerpos puente utilizados en la técnica de Peroxidasa- Antiperoxidasa y de los reactivos .

~~* Como primer anticuerpo puente se ha utilizado la "Peroxidasa-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins" de DAKO :~~

Es una fracción de inmunoglobulinas purificada de antisuero de conejo conjugado con peroxidasa de caballo con una actividad enzimática muy específica.

Inmunógeno : Inmunoglobulinas aisladas de suero de ratón.

Especificidad : El anticuerpo tiene reacción cruzada con inmunoglobulinas de otras especies, como el humano y la rata.

Dilución : La casa comercial recomienda una dilución para inmunohistoquímica de 1: 50 -1:100.

~~* Como segundo anticuerpo puente se ha utilizado la " Peroxidasa-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins " de DAKO.~~

Es una fracción de inmunoglobulina purificada de antisuero de cerdo conjugada con peroxidasa de caballo con actividad enzimática muy específica.

Inmunógeno: Es una inmunoglobulina, fundamentalmente IgG, aislada de suero de conejo.

Especificidad: Este anticuerpo reacciona con inmunoglobulina de conejo fundamentalmente cadenas ligeras y cadenas gamma.

La reacción cruzada con inmunoglobulinas humanas ha sido resuelta por absorción en fase sólida.

El anticuerpo puede tener reacciones cruzadas con inmunoglobulinas de otras especies. Esta reacción cruzada puede ser habitualmente evitada añadiendo suero de las especies con las que se obtenga reacción cruzada.

Dilución: La casa comercial recomienda una dilución de 1:50-1:100.

* Buffer Tris:

Para preparación de dos litros

Tris 1,2 grs.

ClNa..... 16 grs.

Tras preparar esta solución se ajusta el Ph hasta 7,4 con:

ClH 1 N7.6 ml. (aprox.)

ClH 1 N: 85 ml. de ClH + 915 ml. de H₂O

* Preparación de la tripsina:

ClrCa 0,1% 200 ml. a 37°

Tripsina 0,2 0,2 grs.

Esta solución tiene un pH de 5 se ajusta hasta un pH de 7,6 con NaOH.

NaOH 0,1 N NaOH 4 grs.

H₂O 999.6

Dependiendo del peso molecular del NaOH.

* Diaminobencidina:

Diaminobencidina 15 mg.

Tris 0.2 molar..... 6 ml.

ClH 0.1 Normal..... 9.5 ml.

H₂O destilada..... 9.5 ml.

(El pH se ajusta con NaOH 0.1 normal)

- 500 landas de H₂O₂.

Se procede a mezclar el TRIS, el ClH y el H₂O destilada en las cantidades indicadas. una vez hecha esta mezcla se ajusta el pH con NaOH 0.1 normal hasta un pH de 7.6.

Una vez ajustado el pH se vierte esta solución sobre la diaminobencidina, y a continuación se añade el el H₂O₂ .

ClH 0,1 N 8,5 ml de ClH para 991,5 ml. H₂O

V.2.6 TÉCNICAS DE CONTROL DE LAS DE LAS INMUNOTINCIONES.

Dado que por errores en las técnicas se pueden encontrar tanto falsos positivos como falsos negativos ,se han realizado los siguientes controles para asegurar la fiablilidad de los resultados obtenidos en este trabajo.

Los controles realizados para el trabajo son los aconsejados por Palacin en (188) "Técnicas inmunohistoquímicas", que a su vez son las que encontramos en la bibliografía revisada, en los distintos trabajos donde se exponen resultados obtenidos con técnicas de inmunohistoquímica.

Controles realizados:

- Se ha procedido a la sustitución del anticuerpo primario en cada caso por Buffer-Tris exclusivamente.
- Se ha sustituido el anticurpo primario,específico, por otro anticuerpo no relacionado con el antígeno que se estaba investigando (Utilizamos como sustituto el LEU. M1)
- Se ha sustituido el segundo anticuerpo ,puente, por Buffer-Tris.
- Realización de la técnica en muestras de tejidos ya conocidos como positivos, con el Ac en estudio.
- Se han ralizado autocontroles en el estudio del tejido, como en el caso del Factor VIII observando la tinción del endotelio dentro del tejido,y en el caso del S-100 observando tinción positiva de tractos nerviosos dentro de la preparación.

Con la realización de estos controles se intenta asegurar una absoluta fiabilidad de los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación.

CAPITULO VI.

RESULTADOS DEL TRABAJO

EXPERIMENTAL

RESULTADOS DEL TRABAJO**EXPERIMENTAL****VI. 1. VIMENTINA:**

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con la Vimentina.

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tejidos: útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 .

Tejidos: Utero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACION:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en:

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16, 20 y 28.
Endometrio normal Caso: 18
Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18
Cérvix normal. Caso : 18.
Ovário normal. Casos : 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :
Tumor de Células Claras: Casos: 16 y 27.
Adenocarcinoma Endometriode. Casos: 17, 19 y 25.
Tumor de Brenner. Casos: 20 y 23.
Adenocarcinoma Seroso Papilar. Casos: 21 , 22 y 30.
Adenocarcinoma Mucinoso. Casos 24 y 26.

RESULTADOS:

En la Tabla 1 se resumen de forma esquemática dichos resultados.
Para la tinción con la Vimentina establecemos tres grados de tinción positiva: Grado I (positivo débil), Grado II (positivo moderado) Grado III (positivo intenso).

TABLA VI. 1. 1

EXPRESIÓN DE LA VIMENTINA EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS EN CONGELACIÓN (C) Y EN PARAFINA (P) Y EN TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS EN PARAFINA.

	FETO(C)	FETO(P)	ADULTO(C)	ADULTO(P)
OVARIO	P (3)	P (1)	P(3)	N
TROMPA	N	N	--	N
ENDOMETRIO	N	N	--	N
CÉRVIX	--	--	--	N
Ad. Ca. ENDOMETRIO	--	--	--	N
A. Ca. C. CLARAS	--	--	--	N
A. Ca. ENDOMETRIODE	--	--	--	N
A. Ca. PAPILAR SEROSO	--	--	--	N
TUMOR DE BRENNER	--	--	--	N
A. Ca. MUCINOSO	--	--	--	N

Nota: P = positivo (1) = Grado I . (3) =Grado III . N = negativo .

En el Adenocarcinoma de endometrio es positivo el estroma intratumoral, siendo el estroma adyacente normal negativo para la Vimentina.

El estroma del ovario normal adulto en parafina es positivo para la Vimentina.

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

En todos los casos estudiados no aparece expresión del antígeno ni en las trompas ni en el endometrio.

En todos los casos aparece expresión positiva del antígeno estudiado en el epitelio celómico ovárico.

La positividad en la expresión aparece de manera uniforme, no focal. Aparece una tinción intensa de todo el citoplasma y de la membrana citoplasmática. Aunque toda la membrana citoplásmica aparece teñida es en la zona apical donde la expresión es más intensa, lo que expresa una mayor concentración del antígeno estudiado en la membrana citoplásmica apical.

La expresión del antígeno es mucho más intensa en los tejidos en congelación que en los tejidos en parafina, en los que aparece con una expresión débil, aunque con la misma distribución.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

En todos los casos estudiados, al igual que en congelación, la expresión del antígeno es negativa tanto en la trompa como en el endometrio.

En el epitelio celómico ovárico a diferencia de las inmunotinciones realizadas en los tejidos en congelación la expresión del antígeno en el tejido no es uniforme. La expresión varía desde la negatividad en algunas zonas a la expresión débil en otras, marcadamente más débil que cuando la técnica se realiza en tejidos en congelación.

Sin embargo, a pesar de la pérdida de uniformidad y de intensidad en la expresión, la distribución se mantiene igual. Aparece un tinción débilmente positiva en todo el citoplasma y en la membrana citoplásmica, con mayor refuerzo en la zona apical de la célula.

Al igual que se ha observado en los casos en congelación, tanto adultos como fetales, la inmunotinción es marcadamente más intensa en las células epiteliales de los quistes de inclusión que en el resto del epitelio celómico ovárico. También en estas células de los quistes de inclusión encontramos un reforzamiento en la expresión en la membrana citoplásmica apical.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

En los dos casos estudiados en ovarios adultos sanos encontramos una expresión positiva en el epitelio de recubrimiento ovárico. El antígeno aparece marcado de forma intensa y uniforme a lo largo del epitelio. Aparece marcado como positiva, de forma intensa, el citoplasma y la membrana citoplásmica, apareciendo

también la diferencia de distribución dentro de la membrana citoplásmica.

Al igual que en los tejidos fetales nos encontramos mayor intensidad en la expresión en la membrana apical celular.

El epitelio de recubrimiento de los quistes de inclusión aparece con una expresión mas intensa que el resto del epitelio de recubrimiento ovárico, manteniendo, así mismo, el mismo patrón de distribución celular anteriormente descrito.

En el ovario adulto normal en congelación encontramos células de la granulosa teñidas con vimentina. Este hallazgo es focal, no apareciendo en todos los folículos, las células de la teca también aparecen teñidas para la vimentina.

Las células del cuerpo amarillo también aparecen positivas para la Vimentina.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA :

En los tres casos estudiados de trompa adulta normal en parafina, la tinción del epitelio tubárico con Vimentina ha sido negativa.

En el cérvix adulto normal en parafina la tinción del epitelio también es negativa para la Vimentina.

El endometrio normal en parafina tampoco expresa la Vimentina. En el estroma adyacente al endometrio normal no se encuentra expresión positiva para la Vimentina.

En el caso del adenocarcinoma de endometrio, el componente epitelial no expresa la Vimentina, pero se observa que el estroma dentro del tejido tumoral expresa de forma claramente positiva la Vimentina.

En el caso 18 se encuentra un fibroleiomioma que aparece como negativo para la Vimentina, encontrando en la preparación un auto control positivo, ya que se encuentran teñidas las fibras musculares de los vasos.

El epitelio ovárico normal aparece como negativo para la Vimentina.

En el ovario adulto normal en parafina encontramos células de la granulosa teñidas con vimentina, este hallazgo es focal, no apareciendo en todos los folículos, las células de la teca también aparecen teñidas para la vimentina.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Tumor

de Células Claras: Todo el componente epitelial aparece como negativo para la Vimentina. Se encuentra en la preparación un autocontrol positivo ya que se encuentra una tinción positiva en el tejido muscular liso subendotelial.

Adenocarcinoma

Endometriode

Las estructuras glandulares neoplásicas no expresan la Vimentina.

En las áreas de epitelio ovárico normal de superficie tampoco se encuentra expresión para la Vimentina.

Aparece claramente positivo el estroma no tumoral en el ovario, mientras que el estroma intratumoral es negativo en uno de los casos 18 y es positivo en en el caso 19.

Los fibroblastos aparecen como autocontrol positivo.

Tumor de Brenner:

Todo el area tumoral aparece como negativa para la Vimentina, tanto la zona estromal como los nidos epiteliales. El epitelio ovárico normal también aparece como negativo.

Adenocarcinoma

Papilar Seroso: No aparece expresión para la vimentina ni en el estroma ni en el componente epitelial independientemente del grado de diferenciación del tumor.

Adenocarcinoma

Mucinoso: No aparece expresión para la vimentina ni en el estroma ni en el componente epitelial independientemente del grado de diferenciación del tumor.

RESUMEN DE RESULTADOS:

Del trabajo realizado podemos concluir:

- Para el estudio de la expresión de la vimentina en tejidos fetales, en aparato genital interno, es necesario utilizar tejidos en congelación donde la expresión del antígeno aparece de forma intensa y homogénea. La utilización de tejidos incluidos en parafina puede dar lugar a resultados falsamente negativos, dado que la expresión en parafina aparece de forma muy débil y es focal, es decir en gran parte del epitelio aparece como negativa, en contra de la expresión uniforme e intensamente positiva cuando realizamos la técnica en congelación.
- No aparece expresión de la Vimentina ni en la trompa ni en el endometrio, en fetos, tanto en tejidos en parafina como en congelación.
- La expresión de la Vimentina es intensamente positiva en el epitelio ovárico. El citoplasma aparece marcado de forma uniforme. La membrana citoplasmática aparece también positiva. En los tejidos en congelación aparece marcado de forma más intensa la membrana apical de la célula.
- El epitelio de recubrimiento de los quistes de inclusión aparece teñido de forma más intensa que el epitelio de

recubrimiento ovárico, tanto en los ovarios fetales como en los ovarios adultos.

- En algunos casos de los tejidos en congelación hemos podido observar epitelio de la vagina, siendo este intensamente positivo en el 100% del epitelio observado.

- Es de suma importancia una buena técnica en la inclusión del tejido, ya que en los casos de tejidos desestructurados pueden aparecer falsos positivos por difusión del antígeno al estroma.

- En el caso de tejidos en congelación es necesario la inclusión del tejido en OCT, por ejemplo previo a la inmersión del tejido en nitrógeno líquido, para una buena conservación del tejido.

- El epitelio ovárico adulto aparece como negativo para la vimentina, en parafina, en contra de la clara positividad del epitelio en ovarios en congelación. Por lo que, al igual que en los ovarios fetales hay que concluir que para el estudio de la expresión de la vimentina en el epitelio ovárico es preciso utilizar tejidos en congelación.

- Resulta curioso el que no encontremos expresión de la Vimentina en el epitelio del ovario adulto normal, en tejidos en parafina, pero si encontramos un control positivo dentro de las preparaciones, que es la tinción del músculo liso de la pared vascular.

Por lo que podríamos concluir que aún siendo válida la utilización de la Vimentina en tejidos adultos en parafina, puede haber expresiones débiles del antígeno, en algunas células, que no se puedan detectar en parafina, y sí en tejidos en congelación, como se demuestra en este trabajo.

- La expresión de la vimentina es negativa en el epitelio tubárico adulto en parafina.

- Respecto al endometrio, aparece negativo para la Vimentina, apareciendo el estroma adyacente también como negativo.

- En el adenocarcinoma de endometrio, el endometrio tumoral es negativo para la Vimentina, pero se observa el estroma intratumoral como claramente positivo a la Vimentina, en contra de la negatividad para la Vimentina dentro del endometrio normal.

- En ninguno de los tumores epiteliales ováricos aparece expresión positiva de la Vimentina.
- Se encuentran de forma focal células de la granulosa y de la teca, vimentina positiva en ovarios adultos en congelación y en parafina.

TABLA VI. 1. 2

**EXPRESIÓN DE LA VIMENTINA EN EL ENDOMETRIO NORMAL
Y EN EL ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO**

	VIM. POSITIVO	VIM. NEGATIVO
Adenocarcinoma Endometrio		
-Componente epitelial		*
-Estroma	*	
Endometrio Normal:		
-Componente epitelial		*
-Estroma		*

- En el Tumor de Células Claras, en el Tumor de Brenner y, en el Adenocarcinoma Endometroide y en el adenocarcinoma Seroso Papilar ovárico se encuentra que el componente epitelial es negativo para la Vimentina.
 - En la expresión de la Vimentina en el estroma intratumoral encontramos discrepancia entre los dos casos estudiados, en uno de ellos el estroma intratumoral es negativo y en el otro es positivo.
- En ambos casos el estroma no tumoral es claramente positivo.
- El cérvix adulto en parafina no expresa la Vimentina.

VI. 2. DESMINA

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con la Desmina .

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelacion :

Casos: 7, 8, 9, 10 ,11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 .

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACION:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por uteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15 ,16 ,17, 18, 19 ,20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16 ,20 y 28.

Endometrio normal Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cérvix normal. Caso : 18.

Ovario normal. Casos : 17 , 20 , 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

Tumor de Células Claras Casos: 16 y 27

Carcinoma ovárico Endometriode. Casos: 17 , 19 y 25.

Tumor de Brenner. Casos: 20 y 23.

Adenocarcinoma Seroso Papilar. Casos: 21 , 22 y 30.

Adenocarcinoma Mucinoso: Casos 24 y 26.

RESULTADOS

Para la tinción con la Desmina establecemos tres grados de tinción positiva: Grado I (positivo débil), Grado II (positivo moderado) Grado III (positivo intenso).

Pasaremos a describir los resultados obtenidos con las inmunotinciones con la Desmina.

En la Tabla VI. 2. 1. se resumen de forma esquemática dichos resultados.

TABLA VI. 2. 1.

EXPRESIÓN DE LA DESMINA EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS EN CONGELACIÓN (C) Y EN PARAFINA (P) Y EN TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS EN PARAFINA

	FETO (C)	FETO (P)	ADULTO (C)	ADULTO (P)
OVARIO	N	N	N	N
TROMPA (1)	N	N	--	N
ENDOMETRIO (2)	N	N	--	N
CERVIX	--	--	--	N
Ad. Ca. ENDOMETRIO	--	--	--	N
A. Ca. C. CLARAS	--	--	--	N
A. Ca. ENDOMETRIODE	--	--	--	N
A. Ca. PAPILAR SEROSO	--	--	--	N
TUMOR DE BRENNER	--	--	--	N
A. Ca. MUCINOSO	--	--	--	N

Nota: P = positivo (1) = Grado I. (3) = Grado III. N = negativo.

Las tinciones referidas en la tabla son las de los respectivos epitelios.

(1) = El estroma de la trompa fetal en congelación es positivo con una intensidad Grado I.

El estroma de la trompa fetal en parafina es positivo con una intensidad Grado I/0.

(2) = El estroma endometrial es positivo para la Desmina con una intensidad Grado II, tanto en tejidos fetales en congelación como en parafina.

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

OVARIO

No se obtiene ninguna expresión del antígeno en el epitelio.
En el estroma aparece una tinción muy débilmente positiva.

TROMPA

El epitelio aparece como negativo para este antígeno.

En el estroma aparece una tinción positiva grado I.

Marcando la luz de la trompa, no el citoplasma, aparece una imagen lineal continua, con una intensidad grado I.

ENDOMETRIO

No aparece marcado el endometrio con este anticuerpo.

El estroma aparece marcado muy positivo, grado II, parece marcar de forma asilada algunas células dentro del miometrio.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA**OVARIO**

No aparece tinción ni del epitelio de superficie ovárico.

El endotelio fetal no aparece teñido con la desmina, en contra de la positividad con la desmina del endotelio en el ovario adulto en congelación.

El estroma ovárico aparece teñido de forma débilmente positiva.

TROMPA

En la trompa fetal aparece una tinción débil en el estroma.

El epitelio tubárico es negativo para la desmina.

ENDOMETRIO

El endometrio no aparece teñido con la desmina.

En el estroma miometrial se observa una tinción positiva, más intensa cuanto más se acerca a la porción más superficial del miometrio.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN**OVARIO**

Con la desmina aparece una tinción positiva en el endotelio de los vasos del hilio, lo que sirve a su vez de autocontrol positivo dentro de la preparación.

El epitelio ovárico no se tiñe con la desmina.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA

OVARIO

En el ovario adulto en parafina no se observa tinción del epitelio ovárico ni tinción del estroma.

En las preparaciones la tinción positiva Grado III de la muscular de los vasos se utiliza como autocontrol positivo de la preparación.

TROMPA

En la trompa adulta en parafina se observa una tinción positiva de las células musculares, tanto de la capa muscular longitudinal como de la transversal, no observándose diferencia en la intensidad de la tinción entre ambas.

En el estroma los fibroblastos también aparecen como positivos.

El epitelio tubárico no expresa la desmina.

ENDOMETRIO

El endometrio no expresa la desmina.

En las preparaciones para el estudio del endometrio se observa una positividad en las células musculares del miometrio, con una intensidad Grado III. Aparece en las células musculares del miometrio tinción positiva tanto en el citoplasma como en la membrana. No se observa en el miometrio tinción de los vasos.

FIBROLEIOMIOMA

Aparece en las inmunotinciones como desmina positivo.

CÉRVIX

En el cérvix no se observa tinción positiva ni en el endocérnix ni en el ectocérnix, observándose en las preparaciones un autocontrol positivo en la tinción de células musculares adyacentes.

ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO

No aparece tinción positiva en el componente epitelial para la Desmina.

En el estroma aparece una tinción intensamente positiva. Grado III.

NIDO DE WALTHARD

No aparece tinción en este resto embrionario con la desmina.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Adenocarcinoma de

Células Claras:

No se tiñen con la desmina las células tumorales.

El epitelio de superficie ovárico tampoco expresa la desmina.

El estroma tampoco aparece teñido.

Como autocontrol positivo aparece tinción positiva en la muscular de los vasos con una intensidad

Grado III.

Adenocarcinoma

endometriode:

No aparece expresión de la desmina en este tumor.

Aparece una tinción positiva en las células sanguíneas.

Tumor de Brenner:

Aparece una tinción positiva en el estroma.

Todo el componente epitelial del tumor aparece como negativo para la desmina.

Adenocarcinoma Papilar

Seroso:

No aparece expresión de la desmina en este tumor.

Adenocarcinoma Mucinoso: No aparece expresión de la desmina en este tumor.

TABLA VI. 2. 2.

EXPRESIÓN DE LA VIMENTINA Y LA DESMINA EN APARATO GENITAL INTERNO EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS EN TEJIDOS EN CONGELACIÓN (C) Y EN PARAFINA (P)

		VIMENTINA		DESMINA	
		ES	EP	ES	EP
OVARIO	F (P)	N	P (I)	P (0/I)	N
	F (C)	N	P (III)	P (2)	N
	A (P)	P	N	N	N
	A (C)	N	P (III)	N	N
TROMPA	F (P)	N	N	P (0/I)	N
	F (C)	N	N	P (0/I)	N
	A (P)	N	N	P (I)	N
	A (C)	--	--	--	--
ENDOMETRIO	F (P)	N	N	P (II)	N
	F (C)	N	N	P (II)	N
	A (P)	N	N	N	N
	A (C)	--	--	--	--
CÉRVIX	F (P)	--	--	N	N
	F (C)	--	--	N	P
	A (P)	N	N	N	N
	A (C)	--	--	--	--

Nota : ES = Estroma . EP = Epitelio. N = Negativa la expresión. P = Positiva la expresión.

(I) (II) (III) (0) = Intensidades de las tinciones.

En el cervix fetal se observa una tinción positiva del ectocervix.

VI. 3. AE1/AE3

Las inmunotinciones con el anticuerpo AE1/AE3 han sido realizadas en los siguientes casos: 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

- Ovario fetal en congelación: 10, 11 y 12.
- Trompa fetal en congelación: 10, 11 y 12.
- Endometrio fetal en congelación: 10, 11 y 12.
- Cérvix fetal en congelación: 10, 11 y 12.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

- Ovario adulto normal: 17 y 20
- Cérvix: 18
- Trompa: 15, 16 y 20
- Endometrio: 18
- Adenocarcinoma de endometrio: 18

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS.

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS

Para la tinción con el AE1 / AE3 establecemos tres grados de tinción positiva: Grado I (positivo débil), Grado II (positivo moderado) Grado III (positivo intenso) .

TEJIDO FETAL EN CONGELACIÓN

OVARIO

No aparece expresión de los antígenos estudiados con el anticuerpo AE1/AE3.

TROMPA

No aparece expresión de los antígenos estudiados con el anticuerpo AE1/AE3.

ENDOMETRIO

No aparece expresión de los antígenos estudiados con el anticuerpo AE1/AE3.

CERVIX

No aparece expresión de los antígenos estudiados con el anticuerpo AE1/AE3.

TEJIDO ADULTO EN PARAFINA

OVARIO

Se observa que el epitelio ovárico de superficie se tiñe con el anticuerpo AE1/AE3 de forma debilmente positiva, con una intensidad Grado I. Tiñe la membrana citoplásmica, y en el citoplasma se observa un patrón esmerilado.

TROMPA

La trompa en el tejido adulto no expresa los antígenos estudiados con el AE1/AE3.

ENDOMETRIO

El endometrio adulto normal no expresa los antígenos estudiados con el anticuerpo AE1/AE3.

CÉRVIX

En el cérvix no aparece teñido con el anticuerpo AE1/AE3.

ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO

Se observa una tinción negativa dentro de las estructuras glandulares en el adenocarcinoma de endometrio, apareciendo una tinción positiva de Grado I en las zonas de metaplasia escamosa. En contraste a esta positividad de la metaplasia escamosa en el adenocarcinoma endometrial encontramos que las zonas de metaplasia escamosa en el adenocarcinoma endometriode ovárico son negativas para el AE1/AE3.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Adenocarcinoma de

Células Claras:

Aparece en este tumor una tinción positiva Grado I para el AE1/AE3 de una forma muy focal, de igual intensidad que con el PKK 1 y de menor intensidad que en el CAM 5.2.

El citoplasma aparece teñido de una forma muy débil.

La membrana citoplásmica luminal aparece reforzada.

Adenocarcinoma

Endometriode:

Aparece en este tumor negativo todo el componente epitelial de las estructuras glandulares, apareciendo como negativas las zonas de metaplasia escamosa en contra de la positividad que encontramos en estas mismas zonas en el adenocarcinoma endometrial.

Tumor de Brenner:

Aparece una tinción positiva dentro del componente epitelial del tumor tiñendo la membrana citoplásmica con una tinción

de intensidad Grado I. La tinción se presenta de forma homogénea dentro del componente epitelial del tumor, diferenciando claramente los nidos epiteliales del estroma circundante.

Adenocarcinoma Papilar

Seroso: En estos tumores no aparece ninguna expresión con el anticuerpo AE1/AE3.

Adenocarcinoma Mucinoso: En estos tumores no aparece ninguna expresión con el anticuerpo AE1/AE3.

TABLA VI. 3. 1.

EXPRESIÓN DEL AE1/AE3 EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS NORMALES Y EN TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS. (C) CONGELACION, (P) PARAFINA

	Feto (c)	Adulto(p)	Tumores(p)
OVARIO	N	P (I)	--
TROMPA	N	N	--
ENDOMETRIO	N	N	--
CÉRVIX	N	N	--
A. Ca. ENDOMETRIO	--	--	N(a)
A. Ca. CÉLULAS CLARAS	--	--	P(I)
A. Ca. ENDOMETRIOIDE	--	--	N
TUMOR DE BRENNER	--	--	P(I)
A. Ca. PAPILAR SEROSO	--	--	N
A. Ca. MUCINOSO	--	--	N

P = tinción positiva . N = tinción negativa (a) =tinción positiva en areas de metaplasia escamosa. (I) = tinción positiva intensidad grado I.

RESUMEN DE RESULTADOS

- Los antígenos estudiados con el anticuerpo monoclonal AE1/AE3 no se expresan en el tejido fetal estudiado.
- En el tejido adulto estudiado, en parafina, sólo aparece expresión positiva con el AE1/AE3 en el epitelio ovárico. No aparece expresión positiva ni en el endometrio ni en la trompa ni en el cérvix.
- En los tumores ováricos estudiados aparece una expresión positiva, intensidad Grado I, en el Tumor de Brenner y en el Tumor de Células Claras. No se ha observado diferencia en el patrón o intensidad de la tinción según el grado de diferenciación del tumor.
- En el adenocarcinoma de endometrio se ha observado una tinción negativa en las glándulas tumorales, pero se observa en las zonas de metaplasia escamosa una tinción positiva con una intensidad Grado I.

VI. 4. PKK 1

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con el PKK 1.

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas, de histerectomías con doble anexectomía (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal .Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio.Caso: 18.

Cérvix normal.Caso: 18.

Ovario normal. Casos: 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS**TABLA VI. 4 . 1.**

**EXPRESIÓN DEL PKK.1 EN TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN (C)
Y EN PARAFINA Y EN TEJIDOS ADULTOS Y TUMORES EPITELIALES
OVÁRICOS EN PARAFINA (P).**

	FETO (C)	FETO (P)	ADULTO (P)
OVARIO	P (III)	P (I)	P(I)
TROMPA	P (III)	P (0/I)	P(III)
ENDOMETRIO	P (II)	P (I)	N
CÉRVIX	P (III) (a)	--	P (I) (b)
Ad. Ca. ENDOMETRIO --		--	P
TUMOR DE C. CLARAS		--	-- P(I) (f)
A. Ca. ENDOMETRIODE --	--	--	P(III) (f)
A. Ca. PAPILAR SEROSO --	--	--	P(I) (f)
TUMOR DE BRENNER--		--	P(II)
A. Ca. MUCINOSO --	--	--	P(III)

**Nota: (a) = positivo endo y exocervix. (b) = positivo solo exocervix.
(f) = tinción focal.**

Para la tinción con el PKK.1 establecemos tres grados de tinción positiva: Grado I (positivo débil), Grado II (positivo moderado) Grado III (positivo intenso)

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

OVARIO:

En todos los casos estudiados el epitelio ovárico aparece positivo de forma uniforme.

El citoplasma aparece claramente positivo, grado II. La membrana citoplasmática aparece también positiva, en un grado III. La intensidad de la tinción y el patrón de distribución celular es superponible a lo hallado en las tinciones con CAM.5.2. La tinción de fondo del estroma es menos intensa en el caso del PKK.1 que en las tinciones con el CAM 5.2.

TROMPA:

Al igual que en el ovario, se encuentra en la trompa una expresión positiva del antígeno estudiado en la trompa fetal.

Aparece una tinción positiva del epitelio.

El citoplasma aparece teñido positivo, aunque algo menos intenso que en el ovario, en la trompa la intensidad de tinción del citoplasma es de un grado I.

La membrana citoplasmática aparece intensamente teñida, con una tinción grado III. La tinción de la membrana citoplasmática no aparece teñida de una forma uniforme sino presentando un patrón "arrosariado". Otro patrón que se repite claramente en todas las preparaciones es un refuerzo, tanto en la membrana basal como en la luminal, lo que da lugar a una imagen similar a "vias de tren". La tinción citoplasmática es menos intensa con el PKK1 que con el CAM.5.2.

ENDOMETRIO:

En el endometrio también encontramos una expresión positiva del antígeno estudiado.

La tinción de la membrana citoplasmática es menos intensa que en el caso del epitelio ovárico y del tubárico, pero es claramente positiva, presenta una intensidad grado II.

La tinción del citoplasma celular es también positiva, con una intensidad grado I.

Aparece al igual que en la trompa el patrón de "vías de tren" por el reforzamiento en la expresión del antígeno en las membranas basal y luminal.

La tinción es menos homogénea y menos intensa que la obtenida en las preparaciones con el CAM 5.2..

CÉRVIX

El cérvix presenta una tinción en todo el epitelio muy positiva , Grado III en toda la célula.

El patrón encontrado en el cérvix con el Ac PKK1 es igual al que se puede observar con el CAM 5.2.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

OVARIO:

Aunque con la utilización del Ac en estudio en tejidos en parafina se puede observar una expresión positiva, la expresión obtenida con la inmunotinción es mucho más débil que en los tejidos en congelación.

En parafina se obtiene una tinción positiva del Ac en la membrana celular pero no en el citoplasma celular.

La tinción observada en la membrana es menos intensa que en la técnica en congelación, aparece con una intensidad Grado I.

Aunque la expresión obtenida en parafina es débil, es claramente concluyente como positiva.

La tinción es más positiva que para el CAM 5.2.

TROMPA:

Expresión positiva del Ac pero al igual que en ovario y en endometrio la tinción es muy débil y sólo se ha observado en uno de los casos estudiados.

No se observa tinción en el citoplasma.

La tinción de la membrana citoplásmica es muy débil y no se puede observar el patrón "arrosariado" ni el Patrón en "vías de tren" que se repetía en todas las preparaciones de tejidos en congelación en la trompa fetal.

ENDOMETRIO:

La expresión del antígeno es positiva en 5 de los 6 casos estudiados.

Aparece teñida aunque débil la membrana citoplásmica, pero sólo en el borde luminal y en el basal, aunque en el basal es menos intensa que en el luminal.

No aparece en ningún caso tinción positiva del citoplasma.

En parafina no se puede observar el mismo patrón de distribución del antígeno que en congelación.

CÉRVIX:

La expresión del anticuerpo estudiado no se puede valorar en estos casos por no estar bien conservados los epitelios cervicales.

TEJIDO ADULTO EN PARAFINA**TROMPA:**

Se encuentra una expresión positiva del PKK.1 en la trompa adulta en parafina.

La tinción en la trompa adulta en parafina es superponible a la tinción de la trompa fetal en congelación, lo que puede significar que la expresión del antígeno estudiado sea más intensa en el adulto que en el tejido fetal, dado que su expresión en parafina es igual a la expresión en tejidos en congelación en el feto.

La membrana citoplásmica aparece teñida de forma muy intensa, con una intensidad grado III.

La tinción de la membrana citoplásmica no aparece uniforme sino siguiendo un patrón "arrosariado".

Se repite en las preparaciones otro patrón, es el refuerzo de la membrana basal y luminal de las células, los que da una imagen "en vías de tren".

El citoplasma también aparece teñido aunque con menos intensidad que la membrana, el citoplasma se tiñe con una intensidad grado I. Las tincones son algo menos intensas que con el CAM.5.2.

ENDOMETRIO:

No se observa expresión para el PKK.1 en el endometrio normal adulto en parafina, en contra de la expresión positiva del mismo en endometrio fetal, tanto en parafina como en congelación.

CÉRVIX :

Aparecen diferencias en la expresión respecto al feto.

En el cérvix adulto encontramos una expresión negativa en el ectocérvix.

En el endocérvix adulto se encuentra una tinción débil, grado I, sin reforzamiento de la membrana citoplásmica, en contra de una intensidad grado III en el endocervix fetal en congelación.

EPITELIO DE SUPERFICIE OVÁRICO.

El epitelio superficial ovarico expresa positivamente el PKK.1

La expresión es débil, grado I más débil que la expresión que se obtiene en el epitelio con el resto de las citokeratinas.

El citoplasma aparece teñido ,con aspecto vacuolar focalmente dentro del epitelio.

Aparece reforzamiento en la tinción de la membrana basal y del borde apical del citoplasma.

ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO

Aparece una tinción positiva en el componente epitelial del adenocarcinoma de endometrio aunque es débil, de grado I.

En las zonas de meteplasia escamosa aparece una tinción también débilmente positiva, grado I.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Tumor de

Células Claras:

Aparece una tinción positiva dentro del componente epitelial del tumor. La intensidad de la tinción es de un grado I, igual que con el CAM.5.2. Pero con el PKK.1 la tinción es más focal, menos extensa que con el CAM.5.2.

En en amplias zonas del tumor no hay expresión del PKK.1.

Dentro de las áreas más indiferenciadas del tumor aparece más cantidad de tejido epitelial tumoral que es negativo para el PKK.1 que en las zonas más diferenciadas del tumor.

Aparece un refuerzo en la tinción de la membrana citoplásmica.

Adenocarcinoma

Endometriode:

En las zonas de metaplasia escamosa aparece una tinción positiva, grado I, que es menos intensa que la que encontramos con el CAM5.2. y que con el EMA.

El grado de tinción que encontramos con el CAM 5.2. y con el EMA es de un grado III.

Las glándulas tumorales presentan un patrón de intensidad de tinción variable dentro del tumor, la intensidad de la tinción varía de un grado I a un grado III. Se encuentran algunas estructuras glandulares tumorales que son negativas para el PKK.1.

Aparece un reforzamiento en la tinción de la membrana citoplásmica, más marcado en la zona luminal de la membrana citoplasmica.

El patrón se repite superponible en los dos casos estudiados.

Tumor de Brenner :

Los cordones celulares se tiñen con el PKK.1.

Se tiñen las células epiteliales tumorales con una intensidad grado II.

Se tiñe el citoplasma y hay un reforzamiento en la tinción de la membrana.

La tinción es menos intensa que con el CAM5.2.

No aparece teñida la sustancia que aparece en el centro de los cordones.

Adenocarcinoma Papilar

Seroso:

Aparece expresión positiva con el PKK.1 en adenocarcinomas serosos estudiados.

Aparece una tinción positiva en citoplasma y membrana de intensidad Grado I, de forma focal dentro del tumor. El estroma no aparece teñido.

Adenocarcinoma Mucinoso: Aparece una expresión positiva del PKK.1 en los Adenocarcinomas Mucinosos estudiados.

La tinción es uniforme dentro del componente epitelial del tumor, con una tinción Grado III, en la mayor parte del tumor, y en el resto del tumor Grado II-III, la tinción es fundamentalmente citoplásmica, no apareciendo reforzamiento de la membrana, como con el CAM.5.2..

RESUMEN DE RESULTADOS

- Se obtienen resultados positivos con este Ac, el PKK.1. Los Ac estudiados, con el PKK.1 tienen expresión positiva en ovario, trompa y endometrio fetal.
- Concluimos de este estudio que para la investigación con PKK1, al menos en tejidos fetales es preciso utilizar tejidos en congelación, no en parafina.
- Cuando se estudia el Ac en tejidos en parafina la positividad obtenida es más débil, no es uniforme y los patrones

de distribución en los epitelios no aparecen como los obtenidos en congelación.

Por tanto al estudiar una determinada muestra en parafina nos encontraremos con que podríamos obtener una falsa negatividad en su expresión y una incorrecta distribución del Ac dentro del tejido estudiado.

- En tejidos en congelación fetales obtenemos una clara expresión positiva del Ac estudiado en los epitelios ovárico, tubárico y endometrial.

Aparecen de forma repetida unos patrones en los tejidos fetales en congelación:

- Tinción positiva uniforme del citoplasma, grado II en ovario y trompa y grado I en citoplasma endometrial.

- Reforzamiento en la tinción de la membrana basal en todo su contorno.

- La membrana basal aparece aún más reforzada en sus bordes luminal y basal en la trompa y en el endometrio, lo que da lugar a una imagen "En via de tren" en estos epitelios

- La membrana citoplasmática presenta en su tincion un patrón "arrosariado", lo que demuestra que aunque el antígeno se exprese a lo largo de toda la membrana de una forma positiva no lo hace de manera uniforme, siendo en algunos puntos de la membrana más potente la expresión del mismo.

- En los tejidos en parafina la expresion es mucho más débil y no es uniforme, no se repiten de forma completa los patrones de los tejidos en congelación, el reforzamiento de la membrana no es uniforme expresándose sólo en la membrana apical en epitelio ovarico y en el borde luminal en el endometrio. En la trompa, en uno de los casos estudiados, se observa la misma expresión de tinción de la membrana citoplásmica que el tejido en congelación. No se obtiene tinción del citoplasma en ninguno de los tejidos fetales examinados (ovario, trompa y endometrio) en ninguno de los casos estudiados.

- El patrón de tinción en ovario, endometrio y trompa es similar al obtenido con el CAM 5.2., pero menos intenso que el CAM5.2. en trompa y endometrio.

En el epitelio ovárico el patrón y el grado de intensidad son superponibles con el CAM5.2. y el PKK1., pero con el PKK1 se obtiene una menor tinción de fondo del estroma.

- En uno de los casos en congelación que se ha observado el cérvix con muy buena conservación del epitelio se obtiene una tinción claramente positiva e intensa en dicho epitelio, y de forma uniforme igual que se observa con el CAM.5.2.

- Se puede concluir que el PKK.1 se comporta como un antígeno oncofetal, respecto al endometrio, ya que se demuestra su expresión positiva en el endometrio fetal, la desaparición de su expresión en el endometrio normal y la reexpresión en el adeno carcinoma de endometrio.

En base a los hallazgos obtenidos con el PKK.1 podría ser un anticuerpo a utilizar en las hiperplasias adenomatosas atípicas para estudiar su capacidad de predicción de transformación maligna a adeno carcinoma de endometrio.

- Todos los tumores epiteliales estudiados expresan los antígenos estudiados con el PKK.1.

En todos los tumores epiteliales la distribución de la intensidad del antígeno no es uniforme dentro del área tumoral.

- En el Tumor de Brenner la tinción aparece en todos los nidos tumorales, aunque con distinta intensidad. En los demás tumores la tinción positiva aparece de forma focal.

- En el Tumor de Células Claras aparece una tinción positiva del componente epitelial, de la misma intensidad con el PKK1 que con el AE1/AE3 y que con el CAM.5.2.(Grado I). La intensidad de tinción es menor con el PKK1(Grado I) que con el EMA (Grado III).

- Tanto con el PKK1 como con el AE1/AE3 las tinciones son focales dentro del tumor, con estos dos anticuerpos la tinción es más focal que con el CAM 5.2.

- Respecto al grado de diferenciación encontramos que según es más indiferenciado el tumor presenta menor expresión del antígeno

estudiado, es aún más focal en las áreas más indiferenciadas, respecto a las áreas tumorales más diferenciadas.

VI. 5. EMA

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con el EMA.

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10 ,11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACION:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal. Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cervix normal. Caso : 18.

Ovario normal. Casos: 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS

A continuación describiremos los resultados obtenidos en las inmunotinciones con el anticuerpo monoclonal EMA.

En la Tabla VI. 5. 1. se recogen de forma esquemática dichos resultados.

TABLA VI. 5. 1.

**EXPRESIÓN DEL EMA EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS EN CONGELACIÓN (C)
Y EN PARAFINA Y EN TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS EN PARAFINA (P)**

	FETO (C)	FETO (P)	ADULTO (C)	ADULTO (P)
OVARIO	N (a)	N	N	P
TROMPA	P (III)	P (III) (f)	—	P (III)
ENDOMETRIO	P (I)	N	—	P (I) (b)
CERVIX	P (I)	—	—	P (II) (c)
Ad. Ca. ENDOMETRIO	—	—	—	P (III)
TUMOR DE C. CLARAS	—	—	—	P (III)
A. Ca. ENDOMETRIOIDE	—	—	—	P (III)
A. Ca. PAPILAR SEROSO	—	—	—	P (III)
TUMOR DE BRENNER	—	—	—	P (III)
A. Ca. MUCINOSO	—	—	—	P

Nota: (a) = positivo en 1/6 casos y focalmente.

(b) = negativo en la mitad basal del endometrio.

(c) = positivo el exocervix en los dos tercios superiores.

(f) = tinción focal dentro de la preparación.

N = negativa expresión del antígeno. P = positiva la expresión del antígeno.

(I) (II) (III) = Grados de intensidad de la tinción.

(P) = tejidos en parafina. (C) = tejidos en congelación.

Para la tinción con el EMA establecemos tres grados de tinción positiva: Grado I (positivo débil). Grado II (positivo moderado) Grado III (positivo intenso)

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

OVARIO:

Sólo en uno de los casos aparece una tinción muy debilmente positiva grado (entre 0 y I) en un 10% de las células del epitelio.

TROMPA:

Aparece una tinción claramente positiva e intensa.

El citoplasma aparece positivo de forma uniforme con una intensidad grado II .

La membrana citoplásmica aparece reforzada. (grado III). más intensamente se marca la membrana del borde apical.

No se tiñe la membrana basal.

La tinción del citoplasma y membrana, dentro del mismo grado de tinción ,es más marcada que con el CAM5.2. y el PKK1.

ENDOMETRIO:

No se tiñe el citoplasma de la célula.

La tinción de la membrana citoplasmática es positiva pero muy débil grado (entre 0 y I): la membrana citoplásmica del borde apical se encuentra mas marcada.

Se tiñe la membrana basal del endometrio.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

OVARIO:

No aparece tinción del epitelio ovárico en ninguno de los casos.

TROMPA:

No aparece expresión del Ac en el citoplasma de la célula.

Se tiñe de forma positiva la membrana citoplásmica de forma superponible a lo obtenido en tejidos en congelación.

La tinción aún siendo positiva en la membrana y de la misma intensidad que en los tejidos en congelación no es tan uniforme en parafina como en congelación.

ENDOMETRIO:

No aparece expresión en el endometrio con el EMA.

CÉRVIX:

El epitelio cervical no se puede valorar con este anticuerpo por no estar bien conservado en las preparaciones.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN**OVARIO:**

La expresión del antígeno es negativa en todo el epitelio ovárico y en los quistes de inclusión.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA**TROMPA:**

Aparece marcado de forma intensamente positiva el borde luminal de la membrana, con una intensidad grado III.

El citoplasma celular no se tiñe con el EMA.

ENDOMETRIO :

El endometrio normal es negativo para el EMA en la mitad más profunda del mismo, y es débilmente positiva en las membranas luminales y en las áreas de endometrio normal más adyacentes a las áreas de adenocarcinoma.

No se tiñe el estroma.

OVARIO :

Tiñe de forma positiva el epitelio ovárico, de forma intensa, con una intensidad Grado III.

Las células de la granulosa y de la teca no aparecen teñidas con el EMA.

CÉRVIX:

En el ectocérvix encontramos una tinción positiva para el EMA en los dos tercios superiores, no aparece tinción positiva en las células basales.

En el endocérvix aparece una tinción positiva, grado I-II, en la membrana basal luminal de las zonas glandulares más superficiales.

ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO:

Aparece una tinción positiva en las membranas, siendo más intensa la tinción en el borde luminal (Grado III), al igual que en adenocarcinoma endometriode ovárico.

La tinción no es tan homogénea como con el CAM 5.2.

El endometrio normal es negativo para el EMA en las capas más basales y aparece una tinción débilmente positiva en las membranas lumbinales. También se observa una positividad débil en las zonas de endometrio normal próximas a las áreas de adenocarcinoma de endometrio.

No se tiñe el estroma dentro de las áreas de adenocarcinoma de endometrio con el EMA.

NIDO DE WALTHARD :

Aparece teñido con el EMA, al igual que con el CAM 5.2.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS**Tumor de**

Células Claras : Aparece una tinción intensa y difusa citoplásmica

La tinción tiene un intensidad grado III
Marca claramente las estructuras tumorales del estroma.

El estroma no se tiñe con el EMA.

Adenocarcinoma Endometriode: No se tiñen las áreas de diferenciación escamosa en contraste con las tinciones positivas con el CAM 5.2. en las zonas de metaplasia escamosa, en contraste con la tinción intensa y homogénea, en estas áreas con el CAM 5.2. Tiñe de forma positiva tanto la membrana como citoplasma.

Aunque todas las membranas de las estructuras glandulares se tiñen, el

borde luminal aparece teñido con más intensidad (Grado III).

El citoplasma se tiñe con una intensidad Grado I, con un patrón granular, de forma homogénea dentro del tumor.

No hay diferencia del patrón de tinción entre las áreas más o menos diferenciadas del tumor.

No aparece tinción del estroma intratumoral

Tumor de Brenner:

Aparece una tinción intensamente positiva en la zona central de los nidos del tumor, el resto de las células de los nidos aparecen débilmente positivas en todos los nidos, de forma uniforme.

El material intraluminal aparece teñido de forma intensa. También aparece marcado de forma intensa el borde de la membranas luminare.

Adenocarcinoma Seroso Papilar

Tiñe el EMA de forma muy intensa el borde de la membrana basal de las papilas.

La tinción de las membranas basales aparece de forma homogénea en todo el tumor, de la misma forma que en las zonas más o menos diferenciadas del tumor.

La tinción de la membrana basal es de un Grado III.

El citoplasma de las células tumorales no aparece teñido.

La membrana citoplásmica colindante con el tejido vascular de la papila aparece teñido también con una intensidad Grado III.

Adenocarcinoma Mucinoso: Aparece una tinción positiva muy focal dentro del componente epitelial del tumor.

La tinción tiene una intensidad Grado I-II.

La tinción es citoplásmica, no aparece reforzamiento de la membrana. Dentro de la tinción del citoplasma aparece una mayor intensidad en la porción luminal de la célula.

RESUMEN DE RESULTADOS

- No aparece expresión del antígeno estudiado en el epitelio ovárico fetal.
- La expresión del antígeno en el endometrio es muy débil y no uniforme en todos los casos, el resultado de dicha expresión en el endometrio puede considerarse entre muy débil positivo y negativo, en el feto.
- Respecto al ovario, en el feto, no hay diferencias entre congelación y parafina, en ambos casos la tinción es negativa.
- Respecto al endometrio los dos únicos casos débilmente positivos se han encontrado en tejidos en congelación, todos los casos en parafina eran claramente negativos, en el feto.
- En la trompa fetal, tanto en congelación como en parafina encontramos una expresión positiva, esta es incompleta en los tejidos en parafina, ya que no tiñe el citoplasma.
- Podemos concluir que el antígeno en estudio se expresa claramente en la trompa fetal, cuando se utilizan tejidos en congelación y no se expresa en el epitelio ovárico y con muy débil positividad y poco uniforme, en el endometrio fetal.
- El EMA aparece como un buen marcador del epitelio tubárico fetal.

- Al igual que con los otros Ac ya descritos podemos resumir que para obtener resultados concluyentes hay que utilizar tejidos en congelación y no en parafina.
- En el epitelio ovárico no hay expresión del antígeno estudiado, ni en congelación ni en parafina.
No hay diferencia de expresión entre el ovario adulto y el fetal; ninguno de los dos expresan los antígenos estudiados con el EMA.
- El endometrio fetal expresa de una forma débil y no uniforme el antígeno en la membrana citoplásmica. No hay expresión del antígeno en el citoplasma del endometrio.
- Los quistes de inclusión del epitelio ovárico tampoco expresan el antígeno.
- Marca de forma positiva el epitelio cervical en fetos aunque con menos intensidad que el PKK1 y que el CAM 5.2.
- Las células de la granulosa y de la teca en el ovario adulto en parafina aparecen negativas para el EMA.

VI. 6. CAM 5.2.

Exprondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con el CAM 5.2.

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 .

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal. Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cérvix normal. Caso : 18.

Ovario normal. Casos : 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS

Para la tinción con el CAM5.2 establecemos tres grados de tinción positiva: Grado I (positivo débil), Grado II (positivo moderado) Grado III (positivo intenso).

A continuación pasamos a describir los resultados obtenidos en las inmunotinciones con el anticuerpo monoclonal CAM 5.2.

En la Tabla VI. 6. 1. se exponen de forma esquemática dichos resultados.

TABLA VI. 6. 1.

**EXPRESIÓN DEL CAM 5.2. EN TEJIDOS FETALES Y ADULTOS
EN CONGELACIÓN (C) Y EN PARAFINA (P) Y EN TUMORES EPITELIALES
OVÁRICOS EN PARAFINA**

	FETO (C)	FETO (P)	ADULTO (C)	ADULTO (P)
OVARIO	P (III)	P (O/I)	P (III)	P (III)
TROMPA	P (II)	P (O/I)	--	P (III)
ENDOMETRIO	P (III)	N	--	N
CÉRVIX	P (III)	P (O/I)	--	P (a)
Ad. Ca. ENDOMETRIO	--	--	--	P (III)
TUMOR DE C. CLARAS	--	--	--	P (I)
A. Ca. ENDOMETRIOIDE	--	--	--	P (III)
A. Ca. PAPILAR SEROSO	--	--	--	P (III) (f)
TUMOR DE BRENNER	--	--	--	P (III)
A. Ca. MUCINOSO	--	--	--	P (III)

Nota : (a) En el cervix se obtiene tinción positiva en el endocervix y negativa en el ectocervix, en tejido adulto en parafina.

(f) = tinción focal.

N = tinción negativa. P = tinción positiva.

(I) (II) (III) = Grados de intensidad en la tinción.

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

OVARIO:

El epitelio celómico se marca de forma positiva.

Aparece expresión positiva con el Ac utilizado tanto en el citoplasma como en la membrana citoplásmica.

La membrana citoplásmica presenta un refuerzo muy intenso. Grado II-III, es decir algo menos intenso que en el endometrio.

La tinción de la membrana citoplásmica es uniforme, mas homogénea que en el endometrio.

Los resultados aparecen de forma uniforme en todos los casos.

En los ovarios fetales en congelación se observan células en el estroma CAM 5.2. positivas, que podrían corresponder a células de pregranulosa.

TROMPA:

El epitelio tubárico se marca de forma positiva.

Aparece expresión positiva tanto del citoplasma como de la membrana citoplásmica, del antígeno estudiado, al igual que en el endometrio y en el epitelio ovárico.

El citoplasma aparece marcado con un Grado I-II.

La membrana citoplásmica se tiñe en toda su longitud con una intensidad Grado III.

Se tiñe de forma más intensa la membrana citoplásmica de la zona apical.

Aparece teñida la membrana basal de forma menos intensa que en el endometrio.

Los resultados se repiten de forma uniforme en todos los casos.

ENDOMETRIO:

El endometrio se marca de forma positiva.

Aparece expresión positiva tanto en el citoplasma como en la membrana citoplásmica.

El citoplasma aparece marcado de forma uniforme con una intensidad grado II.

Aparece un refuerzo de la tinción de la membrana citoplásmica, de una intensidad grado III.

La tinción de la membrana citoplásmica presenta un patron "arrosariado".

La membrana basal aparece marcada de forma claramente positiva, y de forma mas intensa que en la trompa.

Los resultados se repiten de forma muy uniforme en todos los casos.

CÉRVIX:

El cérvix expresa de forma positiva los antígenos estudiados con el CAM 5.2., con una intensidad Grado III.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

OVARIO:

En todos los casos aparece una inmunotinción muy débilmente positiva, entre Grados 0 y I.

Sólo aparece muy débilmente marcada la zona apical de la membrana citoplasmática, es decir, no repite el patrón observado en tejidos fetales en congelación.

La expresión de los antígenos estudiados es muy débil en tejidos en parafina, de forma que no es concluyente; por ello es preciso utilizar los tejidos fetales en congelación.

TROMPA:

Sólo en uno de los casos aparece una tinción muy débilmente positiva del epitelio tubárico. En el resto de los casos estudiados en trompas fetales en parafina la expresión de los antígenos estudiados con el CAM 5.2. es negativa.

ENDOMETRIO:

En ninguno de los casos estudiados de endometrio fetal en parafina aparece expresión del Ag estudiado.

CÉRVIX :

Aparece una tinción positiva de intensidad grado 0/I en toda la célula, sin que se observe reforzamiento en la membrana citoplásmica.

Con el CAM 5.2. la tinción del epitelio cervical es mas intensa que con el EMA.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN

OVARIO:

Aparece una tinción claramente positiva en el epitelio de superficie.

La tinción tiene una intensidad Grado III. su aparición es focal. Los quistes de inclusión aparecen intensamente teñidos, con una intensidad grado III.

En los quistes de inclusión la tinción es muy uniforme.

En el ovario se observan células de la granulosa teñidas de forma positiva para el CAM 5.2, con una intensidad Grado III.

Las células de la teca no aparecen teñidas.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA

OVARIO :

El epitelio de superficie aparece marcado de forma intensa Grado II.

La membrana citoplásmica aparece marcada con una intensidad Grado III.

El citoplasma se tiñe de forma irregular.

La tinción del epitelio de superficie es focal, apareciendo amplias zonas del epitelio como negativas.

En el ovario se observan células de la granulosa teñidas de forma positiva para el CAM 5.2, con una intensidad Grado III.

Las células de la teca no aparecen teñidas.

TROMPA:

Aparece teñida la membranas citoplasmáticas.

Aparece un reforzamiento claro de la tinción en la membrana basal y apical, con un Grado III.

El citoplasma aparece teñido con menos intensidad con un grado I.

ENDOMETRIO:

El endometrio normal no se tiñe con el CAM 5.2.

CÉRVIX:

El ectocérvix no se tiñe con el CAM5.2.

El endocérvix sí aparece teñido, apareciendo una tinción muy positiva de la membrana citoplásmica, con una intensidad Grado III.

ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL

Aparece una tinción positiva en las estructuras glandulares endometriales, al igual que en el carcinoma endometriode ovárico. La tinción dentro del tumor no es homogénea, apareciendo estructuras glandulares que no expresan el antígeno estudiado. A pesar de ser focal la tinción dentro del tumor la mayoría de las estructuras glandulares aparecen teñidas.

Aparece un reforzamiento de la membrana citoplásmica con una intensidad Grado III.

En las zonas de metaplasia escamosa aparece una tinción intensamente positiva.

El CAM5.2. se comporta como un marcador oncofetal. ya que aparece en el endometrio fetal. desaparece su expresión en el endometrio adulto y reaparece en el adenocarcinoma de endometrio.

NIDO DE WALTHARD

Aparece teñido de forma positiva con el CAM 5.2.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Tumor de Células Claras: Tiñe de forma positiva las células tumorales.

La tinción tiene una intensidad grado I.

La tinción de la zona tumoral es menos intensa que con el EMA, PKK1 y que con el AE1/AE3.

El citoplasma aparece teñido de forma granular.

La tinción dentro del tumor es de forma focal.

Los patrones de tinción son iguales en las zonas mas diferenciadas que en las más indiferenciadas.

Adenocarcinoma endometriode: Aparece una tinción positiva en las estructuras glandulares.

La tinción no es homogénea en todo el tumor.

Algunas de las estructuras glandulares son negativas.

Aparece un reforzamiento de la membrana citoplásmica , Grado III.

El citoplasma aparece con un patrón esmerilado y no granular como con el EMA.

Aparece una tinción intensamente positiva en las áreas de metaplasia escamosa.

Tumor de Brenner :

Aparece una tinción positiva en los nidos tumorales. El estroma es negativo. El CAM 5.2. no tiñe el material intra-luminal, en contra de la tinción positiva de este material con el EMA.

Se observa un refuerzo en la tinción de la membrana citoplásmica alrededor de la luz dentro de los nidos tumorales. El refuerzo en la tinción de esta membrana es de menos intensidad que con el EMA.

Adenocarcinoma Papilar

Seroso:

El CAM 5.2. tiñe de forma intensa la membrana celular, con una intensidad Grado III.

La tinción no es homogénea dentro del tumor.

Algunas de las papilas son negativas para el CAM 5.2.

No aparece diferencia en el patrón de tinción entre las zonas más o menos diferenciadas del tumor.

Adenocarcinoma Mucinoso: Aparece una tinción intensamente positiva, tanto en la membrana como en el citoplasma.

La tinción tiene una intensidad Grado III.

Aparece un reforzamiento intenso de la membrana citoplásmica.

Este reforzamiento de la membrana solo aparece con el CAM 5.2., no lo encontramos en las inmunotinciones con el EMA o con el PKK.1.

La tinción es uniforme dentro del tumor.

RESUMEN DE RESULTADOS

- El CAM 5.2. se expresa de forma claramente positiva en los epitelios tubárico, ovárico y endometrial, en el feto.
- Al igual que con el resto de los Ac ya expuestos para obtener resultados concluyentes es preciso utilizar tejidos fetales en congelación.
- En los tres epitelios ovárico, tubárico y endometrial se tiñen de forma intensa y uniforme el citoplasma, observando una menor intensidad en la tinción en el citoplasma del epitelio tubárico que en el epitelio ovárico o endometrial. El citoplasma tubárico presenta una intensidad Grado I-II frente a un grado II en el ovario y en el endometrio.
- La membrana citoplásmica se tiñe en los tres epitelios de forma uniforme.
- En el ovario aparece con la misma intensidad toda la membrana, con un Grado III.
- En la trompa marcada con una intensidad Grado III, aparece más reforzada la membrana apical.

- En el endometrio la membrana aparece marcada con una intensidad grado III, mostrando un patrón "arrosariado".
- La membrana basal se tiñe tanto en el epitelio tubárico como en el endometrial, siendo en este último la tinción más intensa.
- El cérvix aparece marcado con la misma intensidad que el PKK1. Se observa una tinción de toda la célula sin reforzamiento de la membrana citoplásmica.
- En parafina se obtiene expresión débil con el CAM 5.2. ni en la trompa ni en el endometrio, siendo muy débil y no concluyente la expresión obtenida en el ovario, en el feto.
- Las células de la granulosa aparecen como positivas con el CAM 5.2. tanto en tejido ovárico normal, en parafina como en congelación en el adulto.
- En el tejido ovárico fetal en congelación aparecen en el estroma unas células CAM 5.2. positivas, que podrían corresponder a células de la pregranulosa.

El CAM.5.2 se comporta como un marcador oncofetal.

TABLA VI. 6. 2.

**EXPRESIÓN DE LAS CITOKERATINAS CON CAM 5.2., PKK.1 Y AE1/AE3
Y CON EL EMA EN APARATO GENITAL INTERNO EN TEJIDOS FETALES
Y ADULTOS EN TEJIDOS EN CONGELACIÓN (C) Y EN PARAFINA (P)**

		EMA	PKK.1	CAM 5.2	AE1/AE3
OVARIO	F (P)	N	P (I)	P (0/I)	-
	F (C)	N	P (III)	P (II)	N
	A (P)	P	P (I)	P (III)	P (I)
	A (C)	N	-	-	-
TROMPA	F (P)	P (III)	P (0/I)	P (0/I)	-
	F (C)	P (III)	P (III)	P (III)	N
	A (P)	P (III)	N	P (III)	N
	A (C)	-	-	-	-
ENDOMETRIO	F (P)	N	P (I)	N	-
	F (C)	P (I)	P (II)	P (III)	N
	A (P)	P (I)	N	N	N
	A (C)	-	-	-	-
CÉRVIX	F (P)	-	-	P (0/ I)	N
	F (C)	P (I)	P (III)	P (III)	N
	A (P)	P (II)	P (I) (a)	P (III) (a)	-
	A (C)	-	-	-	-

Nota: (P) = tejidos en parafina. (C) = tejidos en congelación.

P = tinción positiva. N = tinción negativa.

(I) (II) (III) (0) = Grados de intensidad de la tinción.

F = tejido fetal A = tejido adulto.

(a) = solo exocérvis en el adulto.

VI. 7. B.G.A.H. (ANTI H-ANTIGENO DE GRUPO SANGUINEO)

Exprondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con el anti H-antígeno de grupo sanguíneo.

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9,10 ,11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16 ,17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal.Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal. Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cérvix normal. Caso : 18.

Ovario normal.Casos : 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS

- La expresión de este antígeno es negativa tanto en las preparaciones de tejidos fetales en parafina, como en los tejidos fetales en congelación.
- En los ovarios adultos, tanto en congelación, como en parafina, también aparece como negativa la expresión del antígeno H.
- En el cérvix adulto y fetal la expresión es negativa.
- En la trompa adulta en parafina, la expresión del antígeno es negativa.
- En el endometrio adulto en parafina, la expresión es negativa.
- En todos los tumores epiteliales ováricos la expresión del antígeno es negativa.
- Sólo en el caso de adenocarcinoma de endometrio estudiado aparece una expresión positiva del antígeno.

- En todos los tumores epiteliales estudiados la expresión de este antígeno es negativa.

VI. 8. FACTOR VIII

Las inmunotinciones con el anticuerpo contro el Factor VIII han sido realizadas en los siguientes casos:

Tejido fetal en parafina : Casos 1, 2, 3, 4, 5 y 6
En estos casos se han realizado inmunotinciones en ovario ,trompa, endometrio y cérvix.

Tejido fetal en congelación : Casos 7, 8, 9, 10, 11 y 12.
En estos casos se han realizado inmunotinciones en ovario, trompa, endometrio y cérvix.

Tejido adulto en congelación: Casos 13 y 14.
En estos casos se ha estudiado exclusivamente ovario.

Tumores epiteliales ováricos: Casos del 16 al 27 y el 30.

La aplicación de este anticuerpo se ha realizado básicamente como anticuerpo control.

A continuación describiremos los resultados.

RESULTADOS

TEJIDO FETAL EN CONGELACIÓN

OVARIO

El epitelio no expresa este antígeno.

TROMPA

El epitelio no expresa este antígeno.

ENDOMETRIO

El epitelio no expresa este antígeno.

CÉRVIX

El epitelio no expresa este antígeno.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA**OVARIO**

No se observa con el Factor VIII ninguna inmunotinción en el epitelio ni estroma ovárico, sólo se observa en uno de los casos estudiados inmunotinción de los vasos de la zona del hilio ovarico, no se observa tinción de pequeños vasos.

Estos hallazgos contrastan con la tinción más intensa y limitada a pequeños vasos que se observa en el ovario adulto en congelación.

TROMPA

No se observan en las preparaciones de trompa fetal en parafina con Factor VIII ninguna inmunotinción de epitelio o de endotelio en la trompa.

ENDOMETRIO

No se observa en el endometrio fetal en parafina ninguna inmunotinción positiva con el factor VIII.

TEJIDO ADULTO EN CONGELACION**OVARIO**

En el ovario adulto en congelación no se observa inmunotinción del epitelio con el Factor VIII.

Se obseva una tinción intensamente positiva en el endotelio vascular, tanto de membrana como de citoplasma.

En el ovario adulto se tiñen pequeños vasos, no solo los vasos del hilio como en el ovario fetal en parafina.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

En el epitelio tumoral no se observa inmunotinción con el Factor VIII.

Se observa una tinción intensamente positiva en el endotelio, tanto de membrana como de citoplasma.

VI. 9. S-100

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con el S-100 .

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10 ,11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal. Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cérvix normal. Caso : 18.

Ovario normal. Casos : 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVARICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

No se observa ninguna expresión del antígeno estudiado, ni en trompa, ni en endometrio, ni en ovario fetales, en congelación.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

No se observa expresión del antígeno ni en trompa ni en endometrio ni en ovario. Solo en 3 casos se ha observado una tinción débilmente positiva en el mesosalpinx.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACION

No se observa expresión del antígeno estudiado en ninguna estructura de los ovarios adultos en congelación estudiados.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA

OVARIO :

El epitelio de superficie ovárico no se tiñe con el S-100.

TROMPA :

No aparece ninguna tinción positiva con el S-100 en la trompa adulta en parafina.

ENDOMETRIO:

No aparece ninguna tinción positiva en el endometrio adulto en parafina con el S-100.

CÉRVIX:

No aparece expresión del S-100 en el cérvix.

NIDO DE WALTHARD:

No aparece ninguna tinción positiva en este resto embrionario con el S-100.

ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO:

No aparece ninguna tinción positiva con el S-100 en el Adenocarcinoma de endometrio.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Tumor de

Células Claras: Aparecen algunos tractos positivos dentro del tumor.

Dentro del estroma no tumoral no aparecen tractos positivos para el S-100.

Adenocarcinoma Endometriode: A nivel subepitelial (Adyacentes al epitelio de superficie ovarico) aparecen teñidos de forma claramente positiva elementos unicelulares con renciación fibrilar que se interpreta como elementos neuroendocrinos o nerviosos.

Dentro de los estructuras glandulares neoplásicas aparecen células positivas para el S-100 por las características de la tinción, esta no parece que se deba a difusión del anticuerpo.

Tumor de Brenner: No aparece ninguna tinción positiva con el S-100 en el tumor de Brenner.

Adenocarcinoma Papilar

Seroso: No aparece ninguna tinción positiva para el S-100 en el Adenocarcinoma Papilar Seroso.

Adenocarcinoma Mucinoso: No aparece ninguna tinción positiva para el S-100 en el Adenocarcinoma Mucinoso.

RESUMEN DE RESULTADOS

- En los tejidos en congelación, tanto adultos como fetales, no se obtiene ninguna expresión del Ag estudiado con el S-100, en el ovario.
 - En tejidos en parafina no aparece ninguna expresión del antígeno en tejidos fetales ni en adultos tanto en trompa como en endometrio.
 - En tejidos fetales en congelación no aparece expresión del antígeno ni en ovario, ni en trompa, ni en endometrio.
 - En ovario fetal en parafina, sólo aparecen teñidos tractos nerviosos en el hilio ovarico. No se tiñe el epitelio. El estroma se tiñe muy débilmente.
 - El epitelio ovárico en parafina, en adulto, no se tiñe con el S-100.
 - En el Tumor de Células Claras y en el AdenoCa. Endometriode aparecen elementos celulares positivos para el S-100, sólo dentro de las áreas de tumor, que se pueden interpretar como elementos nerviosos o neurendocrinos.
- Ni en el Tumor de Brenner ni en el Adenocarcinoma Papilar Seroso, ni en el Adenocarcinoma Mucinoso aparecen estas células S-100 positivas.
- En ninguno de los tumores epiteliales aparece tinción del componente epitelial con el S-100.

VI.10. ALFA-FETO PROTEINA (AFP)

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con la Alfa-Feto .

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

Tejidos: Utero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal. Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cérvix normal. Caso : 18.

Ovario normal. Casos : 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometrioides: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS**TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN**

No aparece expresión del antígeno estudiado ni en trompa, ni en ovario, ni en endometrio fetal en tejidos en congelación.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

No aparece expresión del antígeno ni en endometrio, ni en trompa, ni en ovario fetal en parafina.

En algunos casos (3) aparece una tinción débilmente positiva en el mesosalpinx.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN

En los casos de ovario adulto en congelación no se ha observado ninguna tinción dentro del tejido, es decir el antígeno estudiado no tiene expresión en el ovario adulto en congelación.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA**OVARIO:**

No aparece expresión en el ovario adulto con la AFP.

TROMPA:

No aparece expresión de la AFP.

ENDOMETRIO:

No aparece expresión de la AFP.

CÉRVIX:

No aparece expresión de la AFP.

TUMORES EPITELIALES OVARICOS

Tumor de Células Claras	No aparece expresión de la AFP.
Adenocarcinoma Endometriode	No aparece expresión para la AFP.
Tumor de Brenner	No aparece expresión para la AFP.
Adenocarcinoma Seroso Papilar	No aparece expresión para la AFP.
Adenocarcinoma Mucinoso	No aparece expresión para la AFP.

RESUMEN DE RESULTADOS

- La expresión de este antígeno ha sido negativa en todas las preparaciones estudiadas, en tejidos fetales y en adultos, tanto en parafina como en congelación.
- También se ha encontrado negativa la expresión en ovario adulto en congelación para la AFP.
- Ninguno de los tumores ováricos epiteliales presenta una expresión positiva para la AFP.

VI. 11. ALFA-1-ANTITRIPSINA

Expondremos los resultados de las inmunotinciones realizadas con la Alfa- 1 - ANTITRIPSINA .

Las inmunotinciones han sido realizadas en los siguientes casos:

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en congelación :

Casos: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

tejidos: Útero, trompas, ovarios y de los casos 8 y 9 se incluyeron uréteres y riñones.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones con tejidos de 6 fetos en parafina:

Casos: 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

Tejidos: Útero, trompas y ovarios

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN:

Han sido realizadas preparaciones con 2 ovarios adultos en congelación:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios recogidos de intervenciones quirúrgicas (HT+DA) en mujeres sanas por úteros miomatosos.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA:

Han sido realizadas preparaciones en :

Casos: 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28 y 29.

Tejidos: Trompa normal. Casos: 15, 16, 20 y 28.

Endometrio normal. Caso: 18.

Adenocarcinoma de endometrio. Caso: 18.

Cérvix normal. Caso : 18.

Ovario normal. Casos : 17, 20, 28 y 29.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS:

Han sido realizadas preparaciones en :

- Tumor de Células Claras: 16 y 27.
- Adenocarcinoma endometriode: 17, 19 y 25.
- Tumor de Brenner: 20 y 23.
- Adenocarcinoma Papilar Seroso: 21, 22 y 30.
- Adenocarcinoma Mucinoso: 24 y 26.

RESULTADOS

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

No aparece expresión de la alfa-1-antitripsina ni en el epitelio, ni en el estroma ovárico.

Se observa tinción positiva de las células sanguíneas.

En la trompa fetal no se expresa el anticuerpo.

No aparece expresión del anticuerpo ni en el endometrio ni en el cérvix.

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

Dentro del estroma ovárico se observan de forma muy aislada algunas células con tinción positiva para la alfa-1-antitripsina, con una tinción grumosa del citoplasma.

Se observa una tinción positiva de las células sanguíneas.

No aparece expresión del anticuerpo en la trompa fetal.

No aparece expresión del anticuerpo ni en el endometrio ni en el cérvix.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA

No aparece expresión de la alfa-1-antitripsina ni en el epitelio, ni en el estroma ovárico.

Se observa tinción positiva de las células sanguíneas.

En la trompa no se expresa el anticuerpo.

No aparece expresión del anticuerpo ni en el endometrio ni en el cérvix.

TUMORES EPITELIALES OVÁRICOS

Tumor de Células Claras No aparece expresión.

Adenocarcinoma Endometriode No aparece expresión.

Tumor de Brenner No aparece expresión.

Adenocarcinoma Seroso Papilar No aparece expresión.

Adenocarcinoma Mucinoso No aparece expresión.

VI. 12. Ki-67

Las inmuntinciones Ki 67 han sido realizadas en los siguientes casos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 23 y 24.

Tejidos fetales en congelación: 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En útero, trompa, ovarios y endometrio.

Tejidos fetales en parafina: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En útero, trompa, ovarios y endometrio.

Tejidos adultos en parafina: 15. En trompa.

Tejidos adultos en congelación: Carcinoma de mama para tejido control (24)

RESULTADOS

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

Tanto a nivel de ovario, trompa y endometrio en tejidos fetales en congelación se observan imágenes positivas de tinción intranuclear superponibles a las imágenes que se obtienen en tejido adulto (se utiliza de control de tejido adulto una inmunotinción en carcinoma de mama en congelación, caso 24).

TEJIDOS FETALES EN PARAFINA

No aparecen inmunotinciones con el Ki 67 en tejidos fetales en parafina, por lo que para el estudio de este anticuerpo es necesario utilizar igual que en el tejido adulto tejidos en congelación.

TEJIDOS ADULTOS EN PARAFINA

Se realiza la inmunotinción en trompa adulta en parafina siendo la tinción el anticuerpo negativo.

VI. 13. URO-1 . . . URO-5 . . . URO-8 . . . URO-10.

Las inmunotinciones con los Ac URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10 han sido realizados en los casos y tejidos que se enumeran a continuación:

(Estos anticuerpos solo pueden utilizarse en tejidos en congelación, dado que el material utilizado para el estudio en tumores epiteliales ováricos estaba conservado en parafina no se ha podido realizar el estudio en estos tumores).

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

Se han utilizado para esta técnica los casos:

Casos : 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tejidos: Útero, trompa y ovarios.

Casos: 8 y 9

Tejidos: De los dos casos anteriores se han estudiado riñones y uréteres fetales.

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN

Se han utilizado para esta técnica los casos:

Casos: 13 y 14.

Tejidos: Ovarios adultos en congelación.

RESULTADOS

TEJIDOS FETALES EN CONGELACIÓN

URO -1 :

OVARIO : Tiñe de forma intensa con una intensidad Grado III el epitelio celómico ovárico, de forma homogénea.

TROMPA : Marca con una intensidad Grado III la membrana de las células epiteliales tubáricas. No tiñe el citoplasma.

La tinción aparece de forma homogénea en el epitelio.

Tiñe la membrana basal del epitelio tubárico.

ENDOMETRIO : Tiñe de forma intensa la membrana basal del endometrio.

Tiñe con una intensidad Grado III la membrana citoplásmica del endometrio en su mitad basal, mostrando un patrón "granular". No hay tinción del citoplasma ni del estroma.

CÉRVIX : El endocérnix aparece claramente positivo para el URO-1.

RIÑÓN : Aparecen teñidas con el URO-1 las estructuras glomerulares, de forma muy intensa con un Grado III.

Tiñe con la misma intensidad el urotelio transicional de la pelvis renal y los cálices. Tiñe las estructuras tubulares en la fase de formación de nefrona.

En el feto se tiñen los colectores finales, esta tinción no se encuentra en el riñón adulto.

URÉTER : El uréter se tiñe con el URO-1 con más intensidad que con el URO-10.

URO-5 :

OVARIO : El epitelio ovárico aparece positivo para el URO-5, con una intensidad Grado II.

TROMPA : En la trompa se tiñe la membrana citoplasmática con una intensidad Grado II, es decir de forma algo menos intensa que con el URO-1.

Aparece más intensa la tinción en la porción proximal de la trompa que en la distal.

ENDOMETRIO : El endometrio aparece intensamente teñido con una intensidad Grado III, con un reforzamiento en la tinción de la membrana citoplasmática.

CÉRVIX : Se observa expresión del URO-5 en el endocérnix, de una intensidad Grado III.

El ectocérvix negativo para el URO-5.

RIÑÓN : Se observa una tinción positiva en el Asa de Henle, en los túbulos distales, en los tubulos colectores y en el urotelio, al igual que se ha descrito en el adulto, pero en el tejido fetal se observa una tinción positiva tambien en los túbulos proximales, a diferencia del riñón adulto.

URÉTER : Aparece una tinción claramente positiva del urotelio ,de forma intensa y homogénea.

URO-8

OVARIO : No aparece ninguna expresión de este anticuerpo en el ovario fetal.

TROMPA : No aparece niguna expresión de este antígeno en la trompa fetal.

ENDOMETRIO : No aparece ninguna expresión de este antígeno en el endometrio fetal.

CÉRVIX : No aparece ninguna expresión de este antígeno en el cérvix fetal.

RIÑÓN : Aparece igual que en el riñon adulto una positividad en la tinción en el Asa de Henle.

URÉTER : Aparece en el urotelio una tinción muy débil no homogénea con grandes áreas negativas, se puede concluir que la tinción en el urotelio es entre débil y negativa en el feto.

URO-10

OVARIO : Aparece una tinción positiva del epitelio celómico ovárico, con una intensidad grado III.

TROMPA : En el epitelio tubárico aparece una tinción débilmente positiva y de forma focal.

ENDOMETRIO : El endometrio aparece marcado positivo de forma débil y focal.

CÉRVIX :	El endocérnix aparece teñido de forma positiva, no apareciendo tinción en el ectocérnix.
RIÑÓN :	En el riñón fetal se observa la misma expresión del URO-10 que en el riñón adulto, es decir, la tinción positiva a nivel de los tubulos proximales.
URÉTER :	A diferencia del urotelio adulto, que no expresa reacción positiva con el URO-10, el urotelio fetal presenta una tinción claramente positiva con el URO-10.

TABLA VI. 13. 1.

EXPRESIÓN EN EL RIÑÓN NORMAL Y UROTELIO EN TEJIDO FETAL Y ADULTO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES URO.

		Túbulo Glomérulo	Asa de Túbulo Proximal	Túbulo Henle	Túbulo Distal	Túbulo Colector	Urotelio
URO-1	Feto (a)	=====			=====		
	Adulto	=====			=====		
URO-5	Feto		=====				
	Adulto					=====	
URO-8	Feto (b)				=====		=====
	Adulto				=====		
URO-10	Feto		=====				
	Adulto		=====				

(a) En riñón fetal las estructuras tubulares en fase de formación de nefrona tambien se tiñen con el URO-1. Los colectores finales se tiñen junto con la pelvis y los cálices.

(b) Con el URO-8 en el uréter fetal se encuentra una tinción entre débil y negativa, siendo en el adulto el urotelio negativo.

Tomado de referencia de información comercial de "Cambridge Research Laboratory "

TEJIDOS ADULTOS EN CONGELACIÓN

OVARIO :

URO-1

Con el URO-1 se observa una inmunotinción de intensidad moderada, de forma focal en el epitelio ovárico.

Se tiñen tanto el citoplasma como la membrana citoplasmática, apareciendo en esta última una tinción más intensa en el borde apical.

El epitelio de recubrimiento de los quistes de inclusión se observa teñido con gran intensidad, aquí el epitelio se tiñe de forma uniforme y no de forma focal como se observa en el resto del epitelio ovárico. Se tiñe con una intensidad Grado II.

URO-5

Con el URO-5 tinción positiva del epitelio ovárico con más intensidad que el URO-1, también de forma focal. Los quistes de inclusión se tiñen de forma mucho más intensa que el epitelio ovárico de superficie, en el caso del URO-5 la intensidad de tinción de los quistes de inclusión ováricos es mayor que con el URO-1.

Los quistes de inclusión se tiñen con una intensidad Grado III.

URO-8

Con el URO-8 se observa una tinción débilmente positiva del epitelio ovárico. En las preparaciones realizadas con el URO-8 no aparecen quistes de inclusión.

URO-10

Con el URO-10 se observa una tinción débilmente positiva del epitelio ovárico. Aparece una tinción positiva de los quistes de inclusión.

TABLA VI. 13. 2.

EXPRESIÓN EN OVARIO ADULTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES URO,

	Epitelio de superficie ovárico	Quistes de inclusión
URO-1	GRADO I/II (F)	GRADO II (U)
URO-5	GRADO II/III (F)	GRADO III (U)
URO-8	GRADO 0/I (F)	--
URO-10	GRADO I (F)	GRADO II (U)

(F) Tinción focal. (U) Tinción uniforme.

TABLA VI. 13. 3.

EXPRESIÓN EN OVARIO, TROMPA Y ENDOMETRIO EN TEJIDO FETAL CON ANTICUERPOS MONOCLONALES URO.

	OVARIO	TROMPA	ENDOMETRIO	CERVIX
URO-1 (a)	=====	=====	=====	=====
URO-5 (b)	=====	=====	=====	=====
URO-8 (c)				
URO-10 (d)	=====	=====	=====	=====

(a) Tanto el epitelio ovárico de superficie como el endometrio fetal (en su mitad basal) y el epitelio tubárico se tiñen con una intensidad de Grado III. El mejor marcador del epitelio tubárico es el URO-1

(b) El endometrio se tiñe con una tinción de Grado III. La trompa se tiñe con una tinción Grado II.

El ectocérvix es negativo. El endocervix es positivo con un Grado III.

(c) No aparece ninguna expresión en aparato genital interno fetal en congelación con el URO-8.

(d) La tinción de los epitelios de la trompa, el endometrio y el ovario aparecen con una tinción

Grado I y de forma focal. El endocérvix se tiñe con el URO-10, no se tiñe el ectocérvix.

== : Expresión positiva del anticuerpo.

FIGURA VI.1**A. *Inmunotinción con el URO-1.***

Se observa una tinción positiva en:

a) Endometrio.

b) Endocérvix.

c) Trompa.

La tinción tiene una intensidad grado III.

Feto en congelación. (2 x).

B. *Inmunotinción con el URO-1.*

Detalle de la inmunotinción del endometrio.

fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme, marcándose las membranas citoplasmáticas.

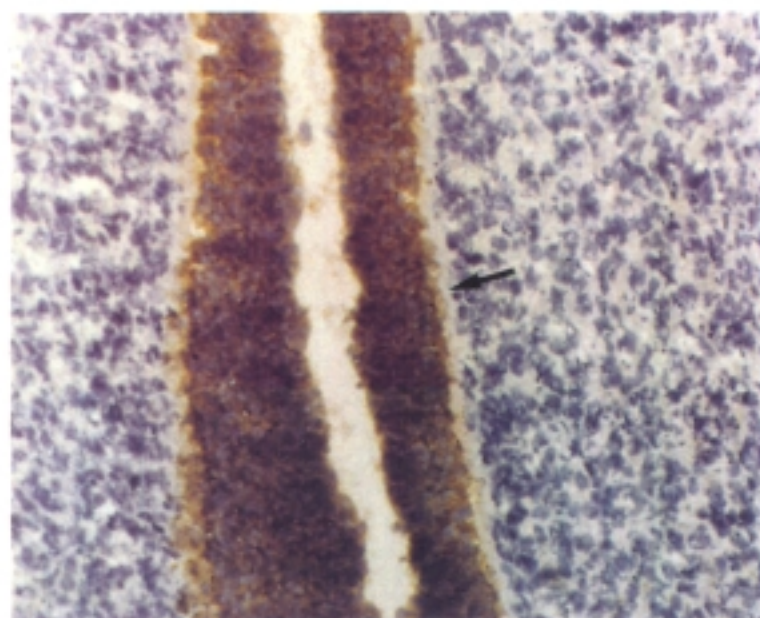
Feto en congelación. (20 x).

NOTA: Las diapositivas han sido realizadas con película Ektachrome 160.

VI.



A



B

FIGURA VI. 2**A. *Inmunotinción con el URO-1.***

Se observa una tinción positiva en:

- a) Epitelio de superficie ovárico
- b) Endometrio.
- c) Endocérvix.
- d) Trompa.

La tinción tiene una intensidad grado III.

Feto en congelación. (1 x).

B. *Inmunotinción con el URO-1.*

Detalle de la inmunotinción de la trompa (a) fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme.

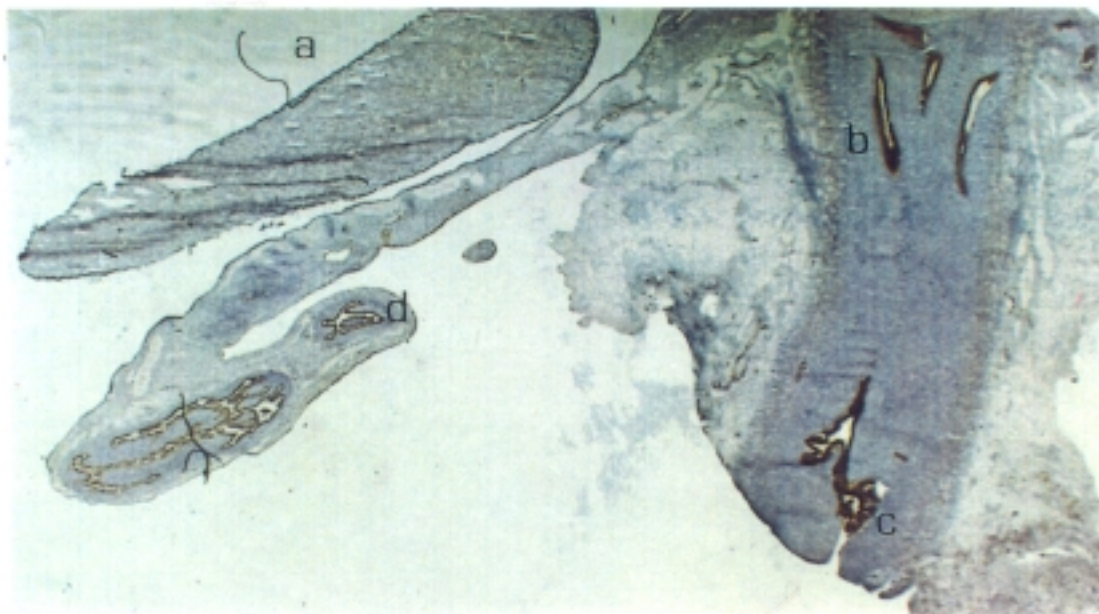
Feto en congelación. (4 x).

C. *Inmunotinción con el URO-1.*

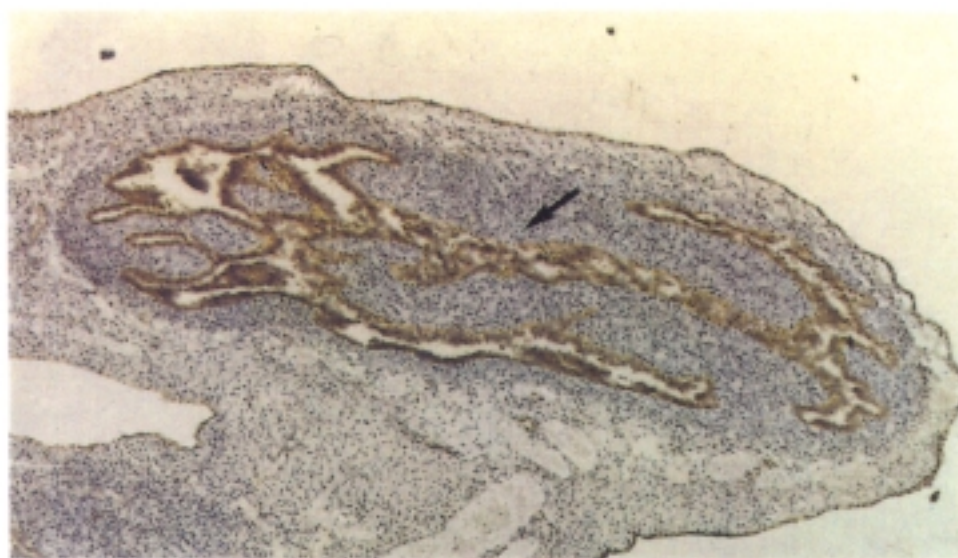
Detalle de la inmunotinción de la trompa (a) fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme, marcándose las membranas citoplasmáticas.

Feto en congelación. (40 x).

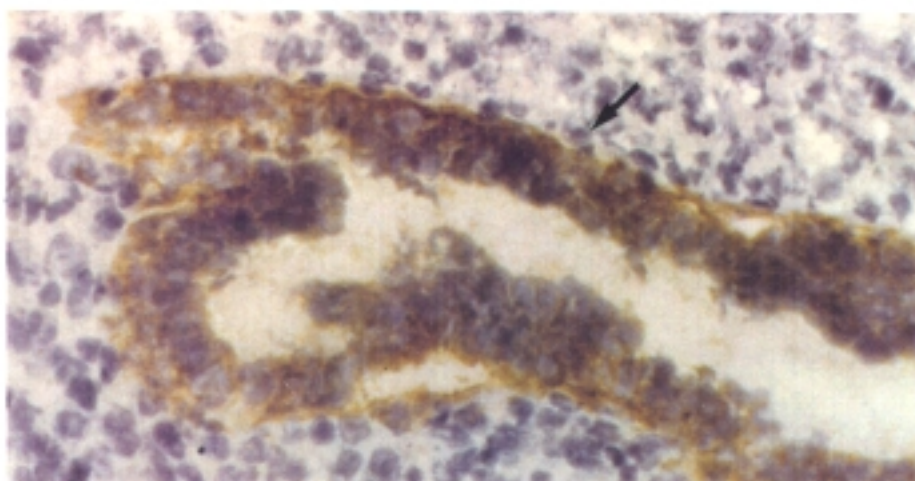
VI. 2



A



B



C

FIGURA VI.3**A. *Inmunotinción con el URO-5.***

Se observa una tinción positiva en:

- a) Epitelio de superficie ovárico
- b) Trompa.

La tinción tiene una intensidad grado II.

Feto en congelación. (2 x).

B. *Inmunotinción con el URO-5.*

Detalle de la inmunotinción del endometrio fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme, marcándose las membranas citoplasmáticas.

Feto en congelación. (4 x).

C. *Inmunotinción con el URO-5.*

Se observa una tinción positiva en:

Trompa, observándose mayor intensidad en la tinción en la porción proximal (a), que en la distal (b). Feto en congelación. (4 x).

D. *Inmunotinción con el URO-5.*

Tinción positiva (Grado II) en el epitelio de superficie ovárico.

Tinción homogénea.

Feto en congelación. (20 x).

E. *Inmunotinción con el URO-5.*

Detalle de su localización en la trompa distal, observándose menor intensidad en la tinción en la porción proximal.

Feto en congelación. (20 x).

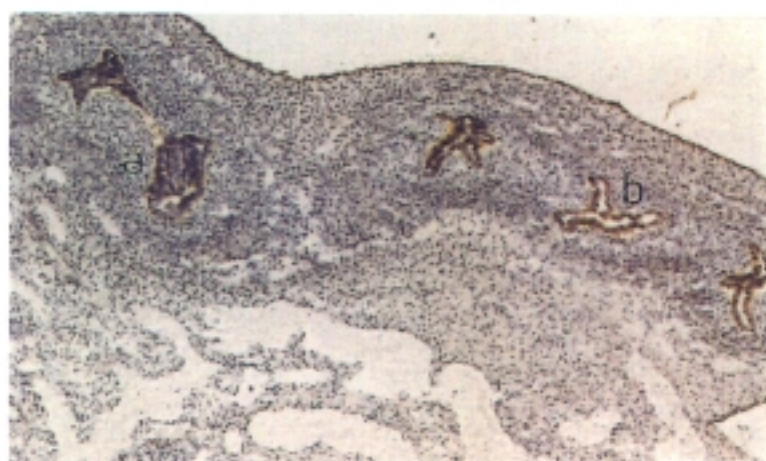
VI. 3



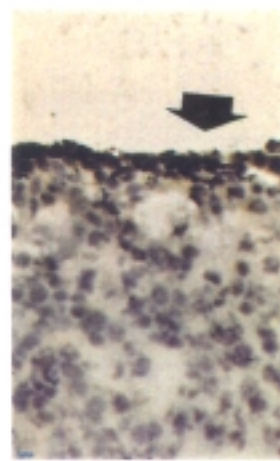
A



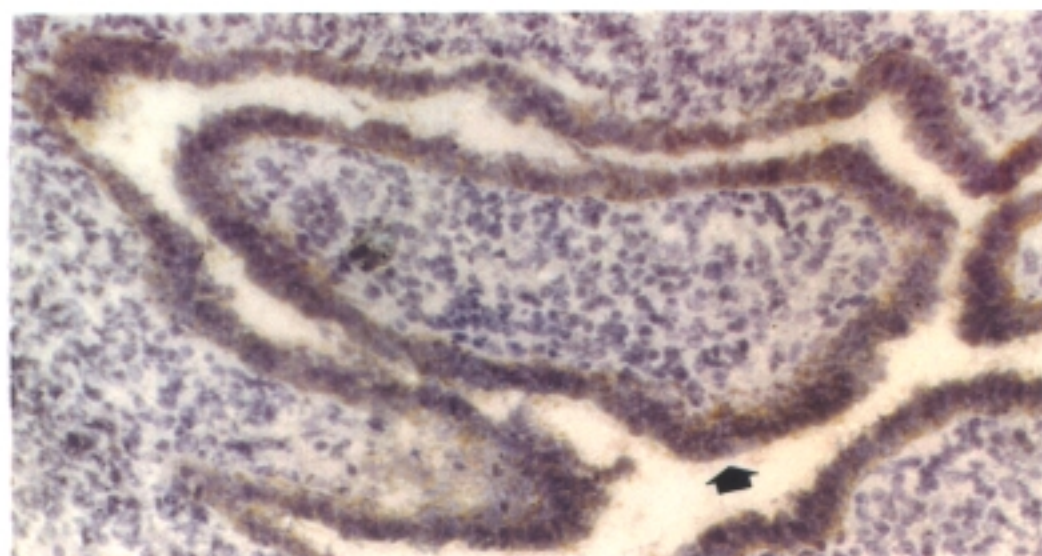
B



C



D



E

FIGURA VI. 4**A. *Inmunotinción con el URO-5.***

Se observa una tinción positiva en: Endocérvix .
La tinción tiene una intensidad grado III.
Feto en congelación. (4 x).

B. *Inmunotinción con el URO-5.*

Detalle de la inmunotinción de un quiste de inclusión ,observándose una intensidad grado III, mas intensa que la del epitelio de superficie ovárico. Inmunotinción uniforme, marcándose las membranas citoplasmáticas.
Ovario adulto en congelación. (40 x).

C. *Inmunotinción con el URO-5.*

Se observa una tinción positiva en:
Epitelio de superficie ovárico.
La tinción tiene más intensidad que con el URO-1, siendo en ambos casos focal.
Ovario adulto en congelación. (20 x).

D. *Inmunotinción con el URO-10.*

Se observa una tinción positiva en:
Endometrio, observándose una intensidad debil y focal. Feto en congelación. (40 x).

E. *Inmunotinción con el URO-1.*

Detalle de la inmunotinción de un quiste de inclusión, observándose una intensidad grado III, más intensa que la del epitelio de superficie ovárico, en el que la tinción es focal
Inmunotinción uniforme, marcándose las membranas citoplasmáticas.
Ovario adulto en congelación. (20 x).

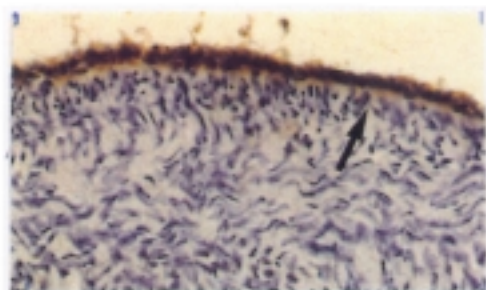
VI.4



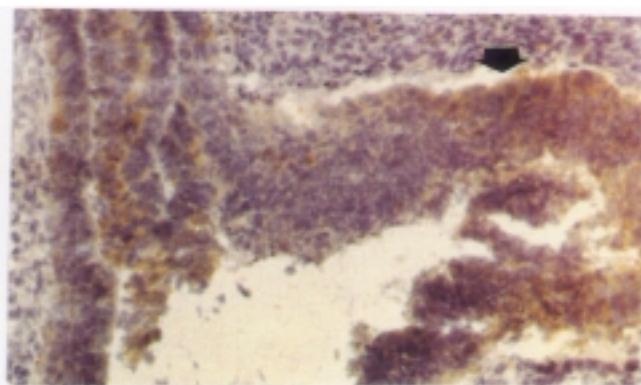
A



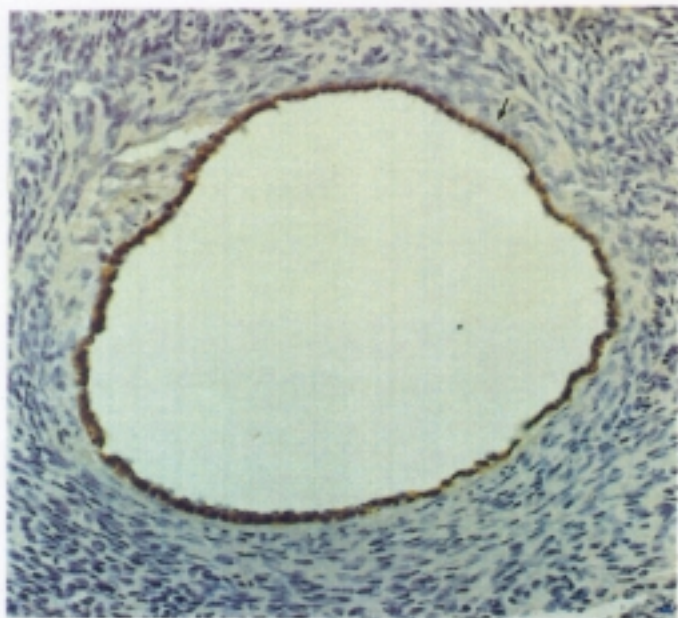
B



C



D



E

FIGURA VI. 5**A. *Inmunotinción con el URO-1.***

Localización del URO-1 en el riñon fetal.

Se observa inmunotinción positiva en :

a) Glomérulos.

b) Túbulos colectores.

Feto en congelación . (2 x).

B. *Inmunotinción con el URO-8.*

Localización del URO-8 en el riñon fetal.

Se observa inmunotinción positiva en :

a) Asa de Henle.

Feto en congelación . (20 x).

C. *Inmunotinción con el URO-10.*

Localización del URO-10 en el riñon fetal.

Se observa inmunotinción positiva en :

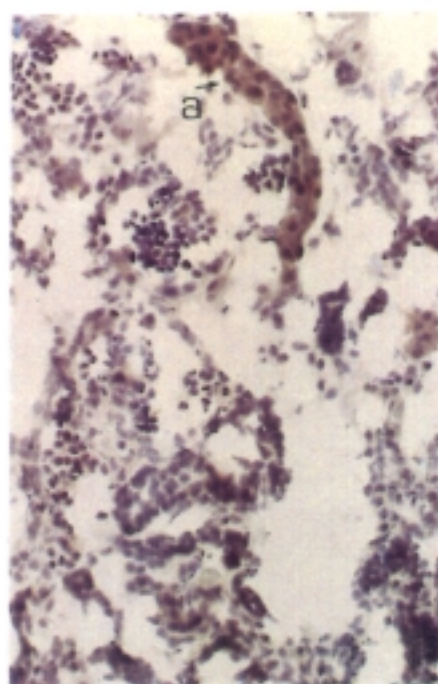
a) Túbulos proximales.

Feto en congelación . (20 x).

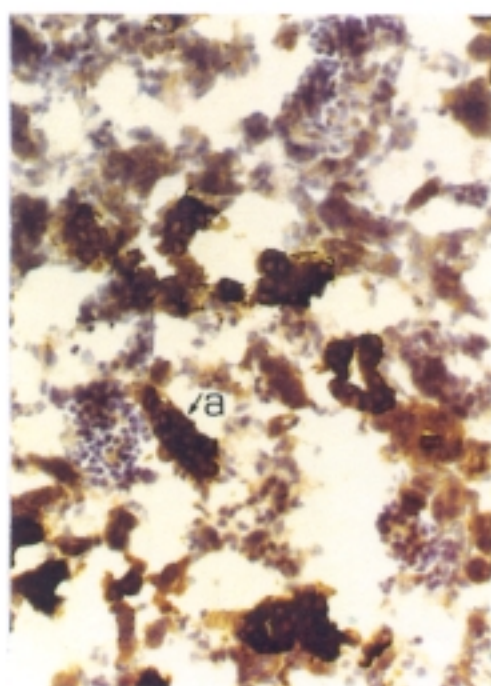
VI.5



A



B



C

FIGURA VI. 6**A. *Inmunotinción con el CAM5.2.***

Se observa una tinción positiva en:

- a) Endometrio.
- b) Endocérvix.
- c) Trompa.

Con una intensidad grado III, con un reforzamiento de la membrana.

Feto en congelación. (2 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción del endocérvix (a) fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme.

Feto en congelación. (20 x).

C. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción del endometrio (a) fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme, con reforzamiento de la membrana.

Feto en congelación. (20 x).

D. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Se observa una tinción positiva en estructuras glandulares, en adenocarcinoma de endometrio, presentando un patrón similar al de endometrio fetal.

Adenocarcinoma de endometrio en parafina . (20 x)

VI. 6

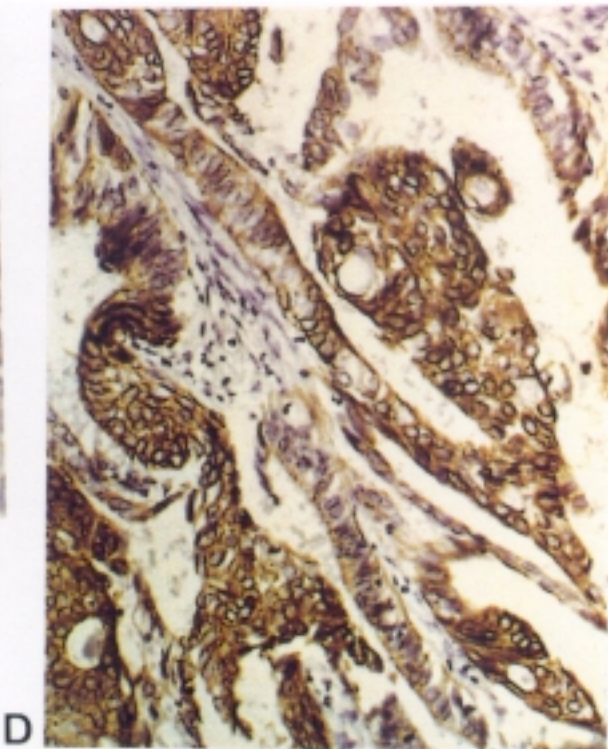
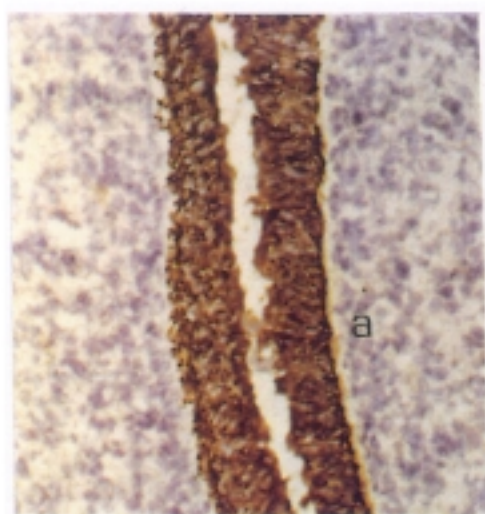
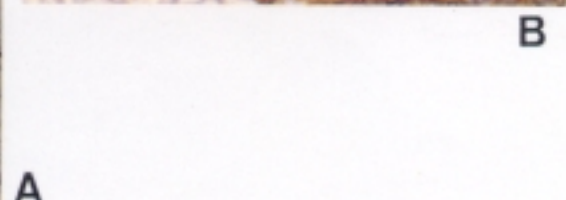
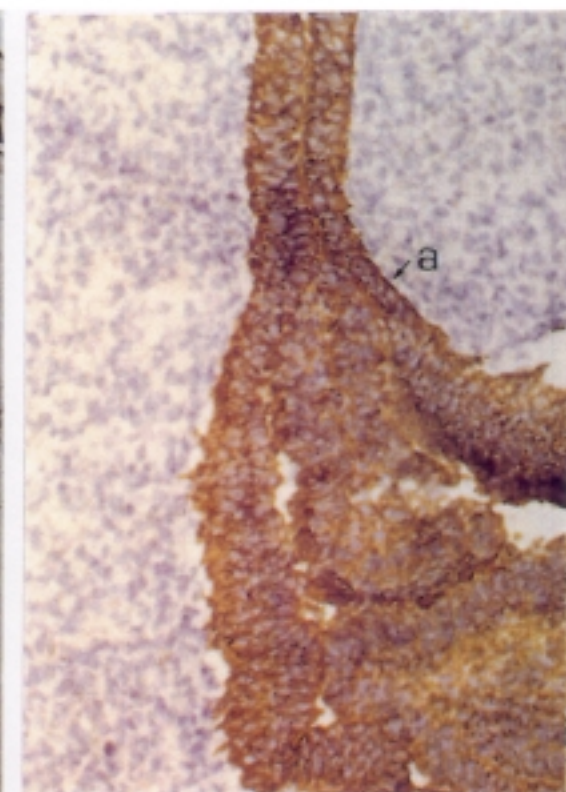


FIGURA VI.7**A. *Inmunotinción con el CAM 5.2.***

Se observa una tinción positiva en la trompa, con una intensidad grado III, con un reforzamiento de la membrana. Feto en congelación. (4 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción de la trompa fetal, observándose una intensidad grado III, de forma uniforme, con reforzamiento de la membrana. Feto en congelación. (20 x).

C. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción de la trompa fetal, observándose una intensidad menor que en los tejidos en congelación, sólo uno de los seis casos de fetos procesados en parafina, aparece positivo. Feto en parafina. (40 x).

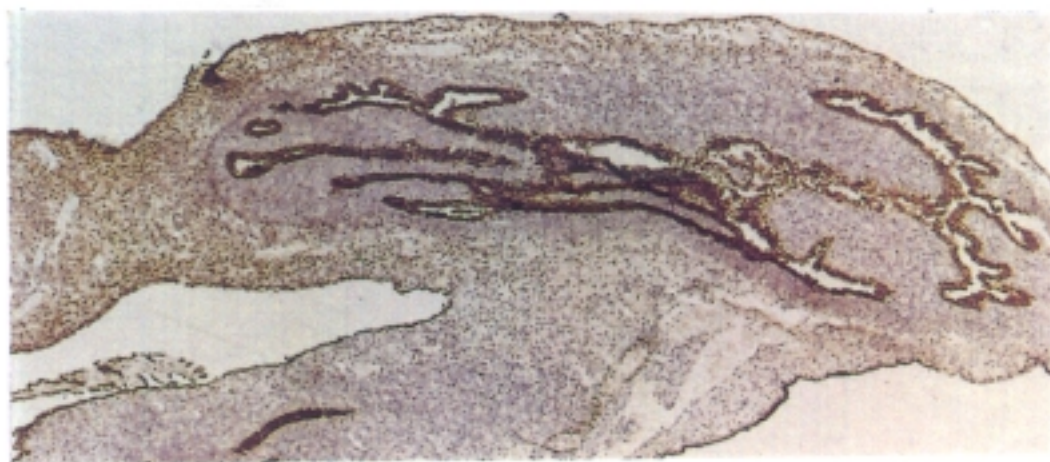
D. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción de la trompa (a), observándose una intensidad grado III, con reforzamiento de las membranas basales y apicales, el citoplasma se tiñe con una intensidad grado I. Trompa de adulto en parafina. (20 x).

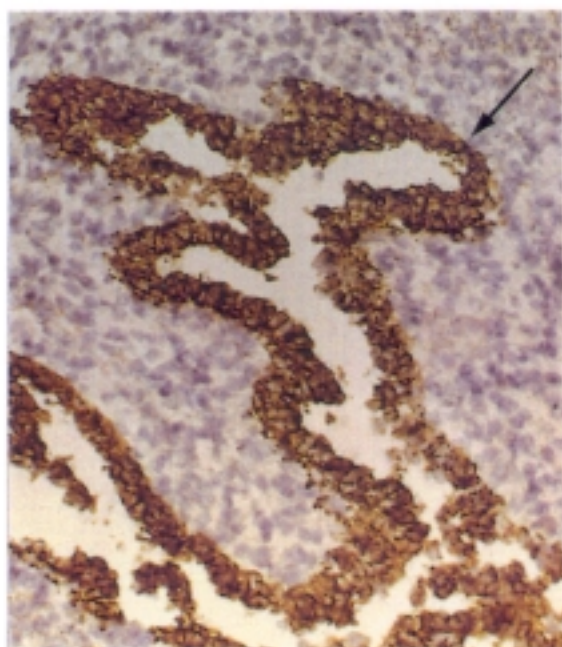
E. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción de la trompa, observándose una intensidad grado III. Trompa de adulto en parafina. (40 x).

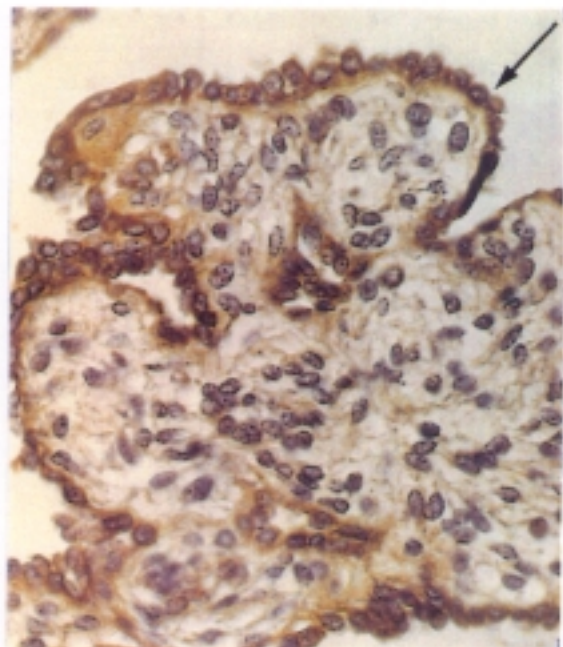
VI. 7



A



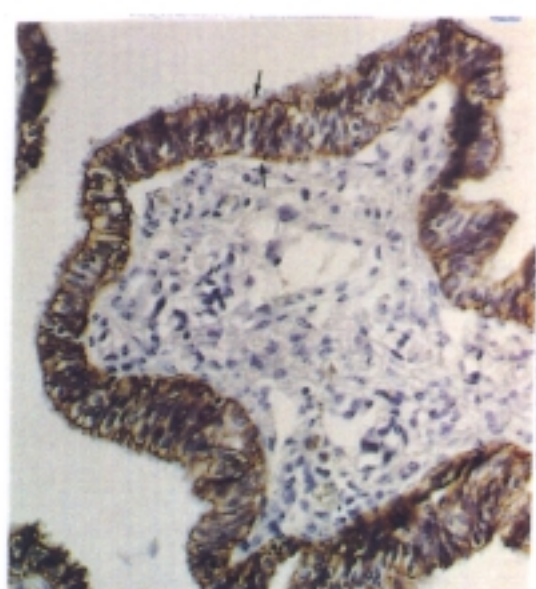
B



C



D



E

FIGURA VI.8**A. *Inmunotinción con el CAM 5.2.***

Se observa una tinción positiva en: Epitelio de superficie ovárico, con una intensidad menor que en las preparaciones fetales en congelación. En parafina solo se evidencia reforzamiento de la membrana apical. Feto en parafina. (10 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Se observa una tinción positiva en:

a) Epitelio de superficie ovárico

Con una intensidad grado II-III, algo menor que el endometrio, con un reforzamiento de la membrana. Feto en congelación. (10 x).

C. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción de un quiste de inclusión (a), y del epitelio de superficie ovárico (b). Intensidad grado III, más homogénea en el quiste de inclusión que en el epitelio de superficie ovárico, donde la tinción es focal. Ovario adulto en congelación. (20 x).

D. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

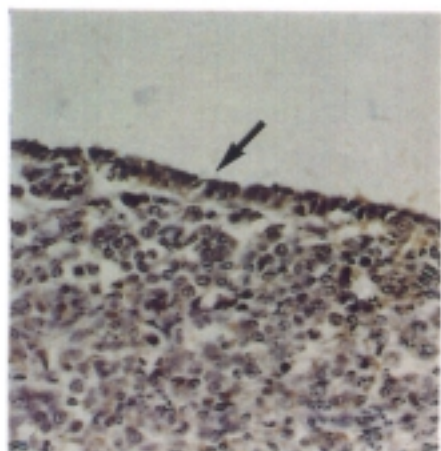
Se observa una tinción positiva en el epitelio de superficie ovárico, intensidad grado III, con un reforzamiento de la membrana. La tinción es focal. Ovario adulto en parafina. (20 x).

E. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

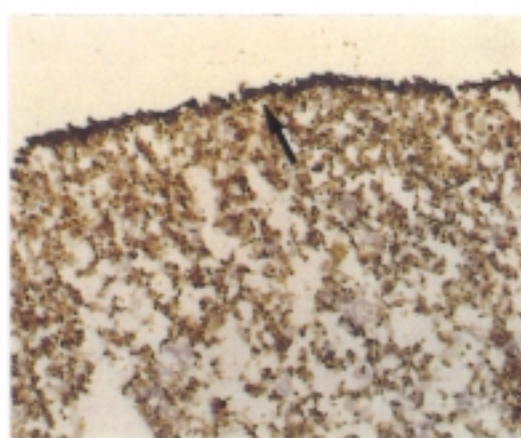
Se observa una tinción positiva la granulosa (a) y negativa en la teca (b).

Ovario adulto en parafina. (40 x).

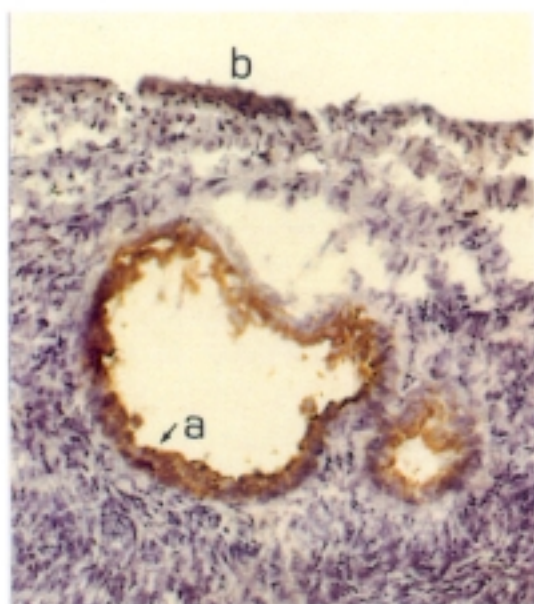
VI. 8



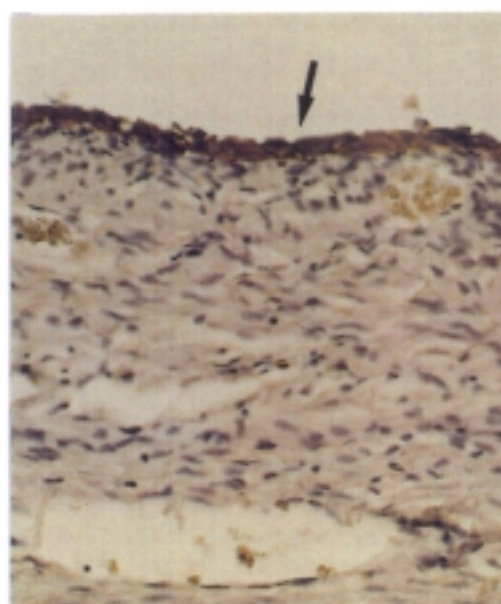
A



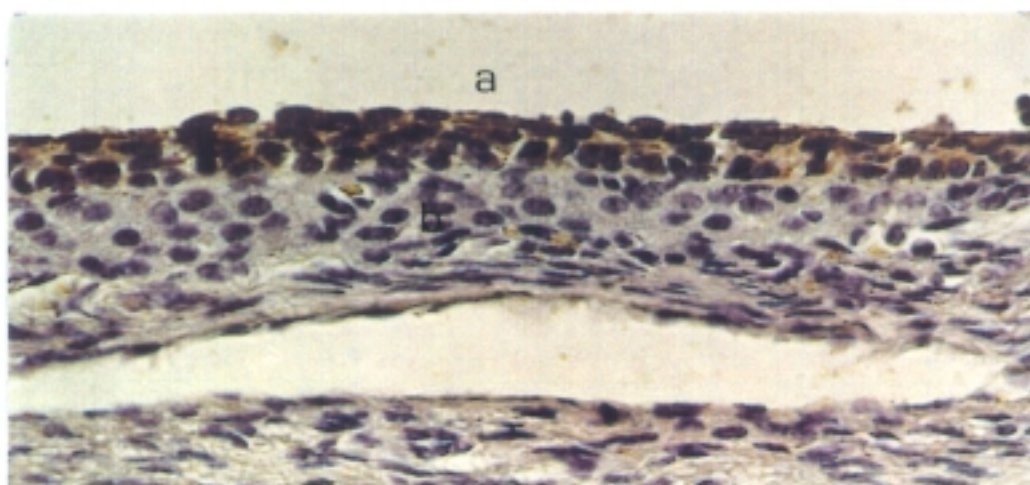
B



C



D



E

FIGURA VI.9**A. *Inmunotinción con el EMA.***

Se observa una tinción positiva en: Trompa.
 Con una intensidad grado III, en la membrana. La
 tinción es más focal que en congelación
 Feto en parafina. (10 x).

B. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en la trompa.
 Con una intensidad grado III, en la membrana.
 Feto en parafina. (20 x).

C. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en la trompa.
 Con una intensidad grado III, mayor reforzamiento
 en la membrana apical.
 Feto en congelación. (20 x).

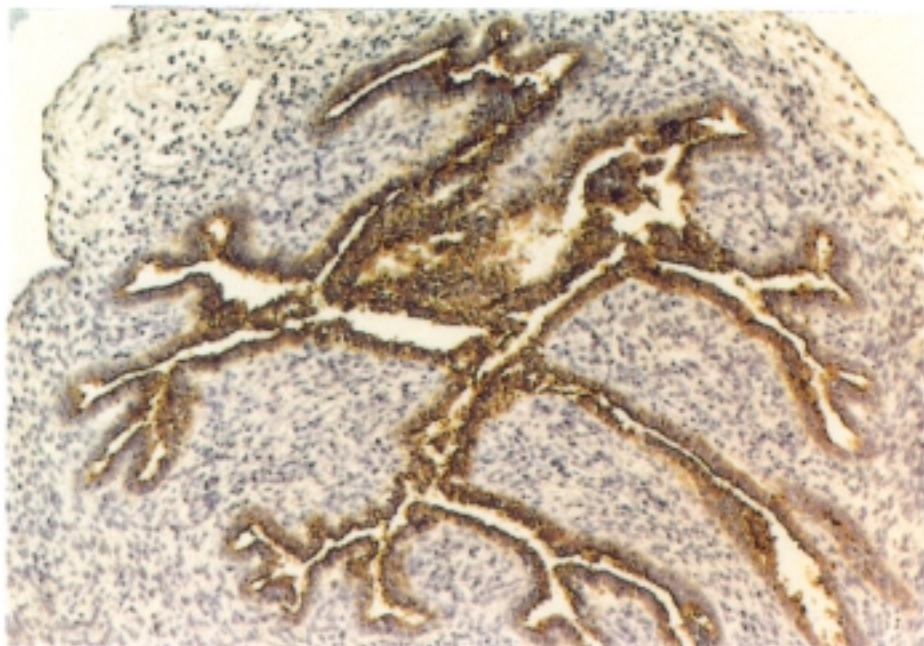
D. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en la trompa.
 Con una intensidad grado III.
 Trompa de adulto en parafina. (4 x).

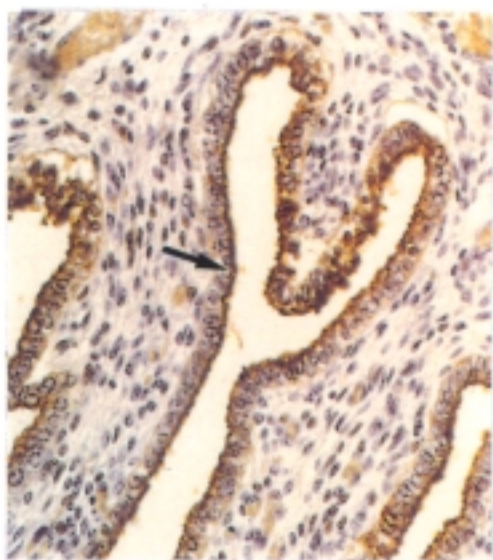
E. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en la trompa.
 Con una intensidad grado III, mayor reforzamiento
 en la membrana apical.
 Trompa de adulto en parafina. (20 x).

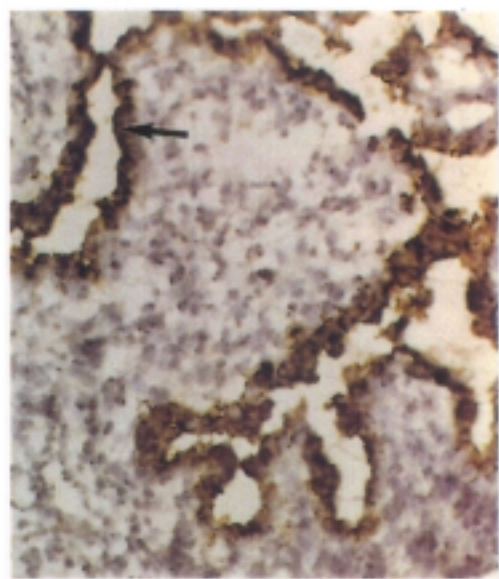
VI. 9



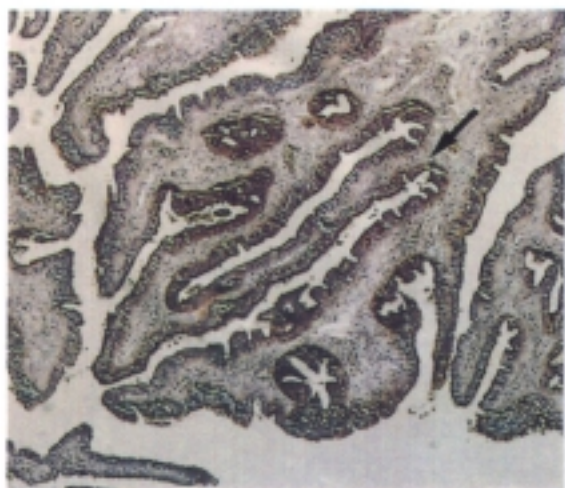
A



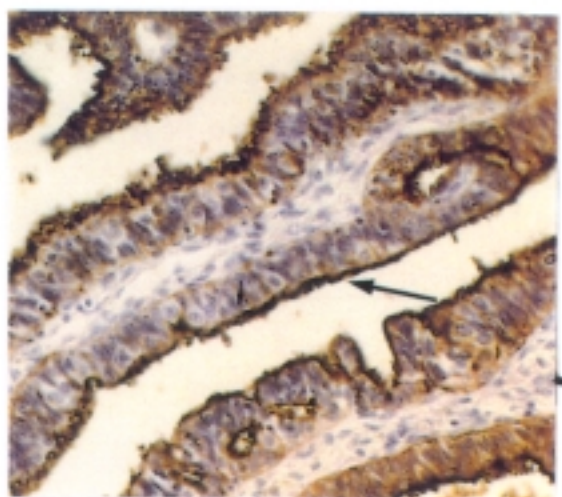
B



C



D



E

FIGURA VI. 10**A. *Inmunotinción con el EMA.***

Detalle de la tinción en el endocérvix.

Con una intensidad grado I-II, con reforzamiento en la membrana basal.

Cérvix de adulto en parafina. (40 x).

B. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en el endocérvix.

Con una intensidad grado I-II, con reforzamiento en la membrana luminal en las estructuras glandulares.

Cérvix de adulto en parafina. (40 x).

C. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción epitelio superficial ovárico.

Con una intensidad grado III.

Ovario de adulto en parafina. (20 x).

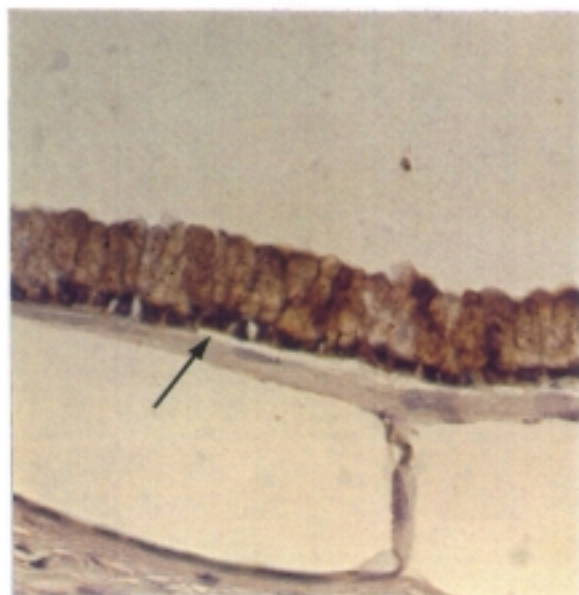
D. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en el ectocérvix.

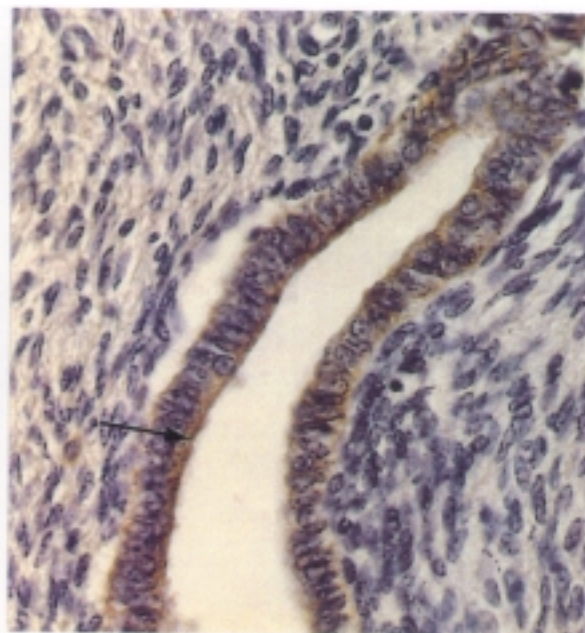
Con una intensidad grado II, en los dos tercios superiores .

Cérvix de adulto en parafina. (20 x).

VI.10



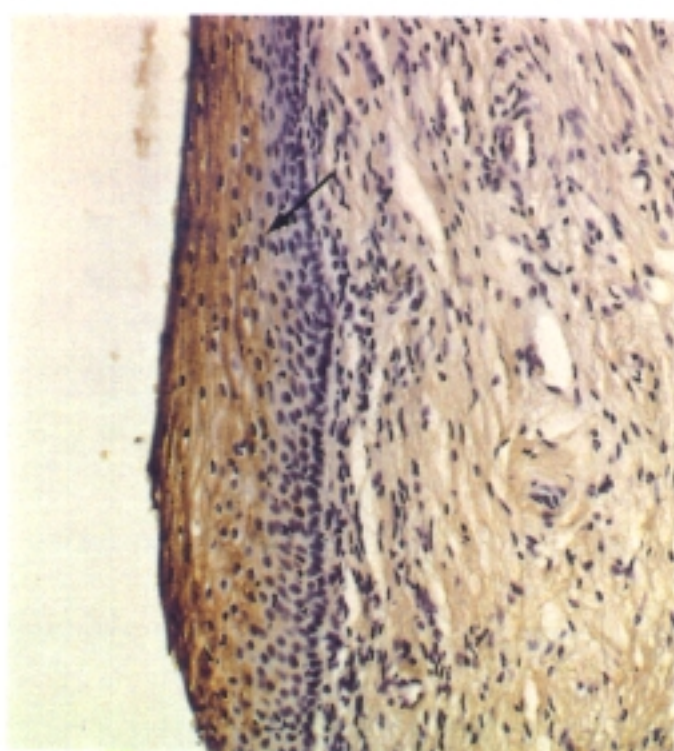
A



B



C



D

FIGURA VI. 11**A. *Inmunotinción con el PKK1.***

Se observa una tinción positiva en:

- a) Trompa.
- b) Epitelio de superficie ovárico.
- c) Endometrio.
- d) Endocérvix.

Feto en congelación. (1 x).

B. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en:

Endocérvix.

Feto en congelación. (4 x).

C. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en:

Endometrio.

Feto en congelación. (20 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en:

Epitelio de superficie ovárico.

Feto en congelación. (10 x).

E. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en:

a) Trompa, b) Ovario.

Feto en parafina. (2 x).

VI.11

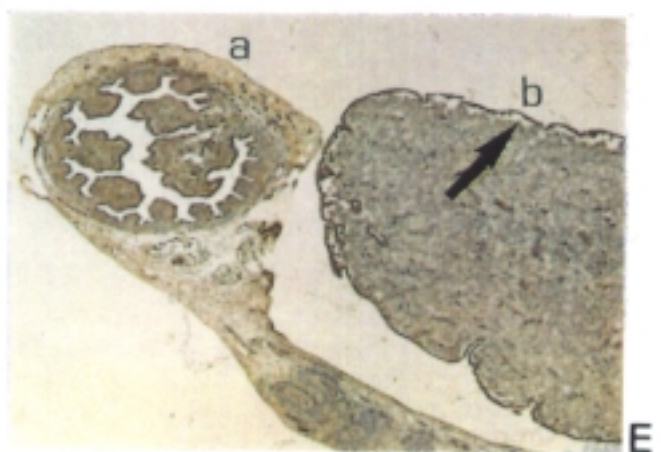
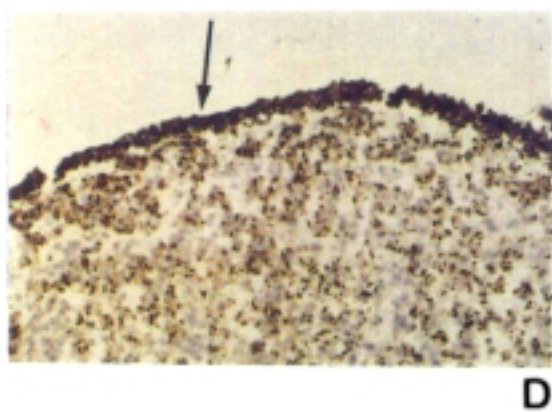
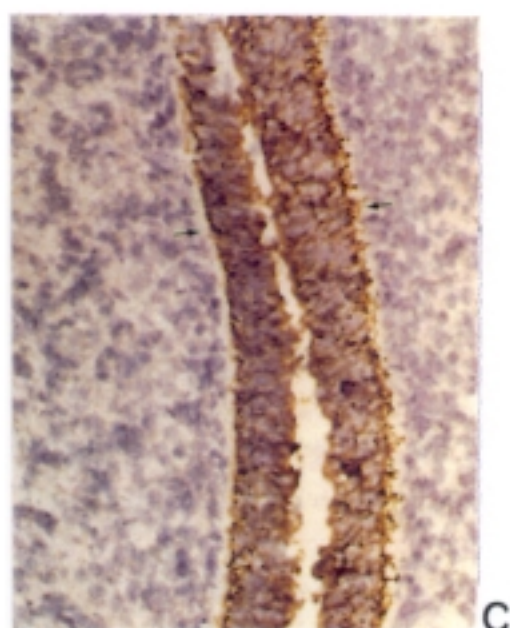


FIGURA VI. 12**A. *Inmunotinción con el PKK1.***

Se observa una tinción positiva en:
Epitelio de superficie ovárico, donde se
obtiene una tinción de menor intensidad que en los
tejidos en congelación. Feto en parafina. (10 x).

B. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en:
Epitelio de superficie ovárico.
Feto en parafina. (20 x).

C. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en:
Trompa, sólo se observa la tinción en uno de los
casos estudiados en parafina. La expresión es más
débil que en congelación.
Feto en parafina. (10 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en el epitelio de
superficie ovárico de menor intensidad que con el
resto de las citokeratinas, estudiadas.
Ovario adulto en parafina. (40 x).

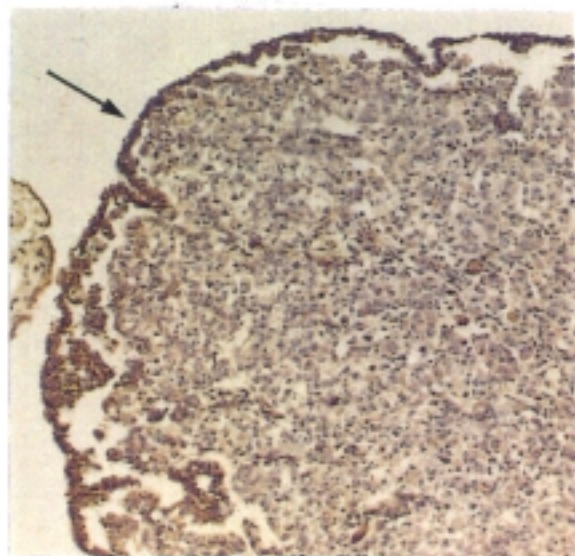
E. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en trompa.
Trompa de adulto en parafina. (40 x).

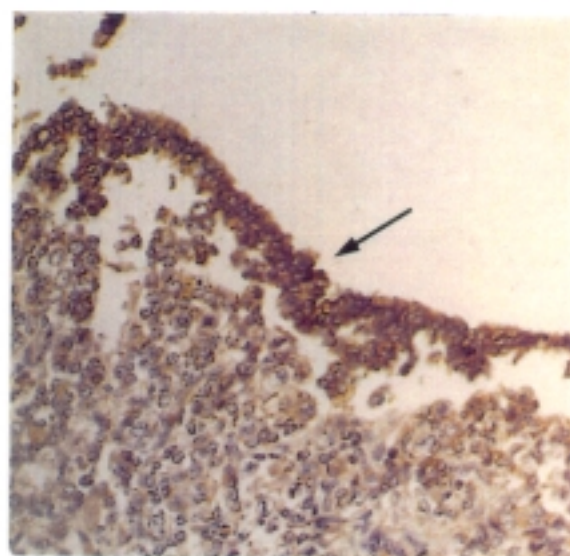
F. *Inmunotinción con el PKK1.*

Se observa una tinción positiva en trompa.
Trompa de adulto en parafina. (40 x).

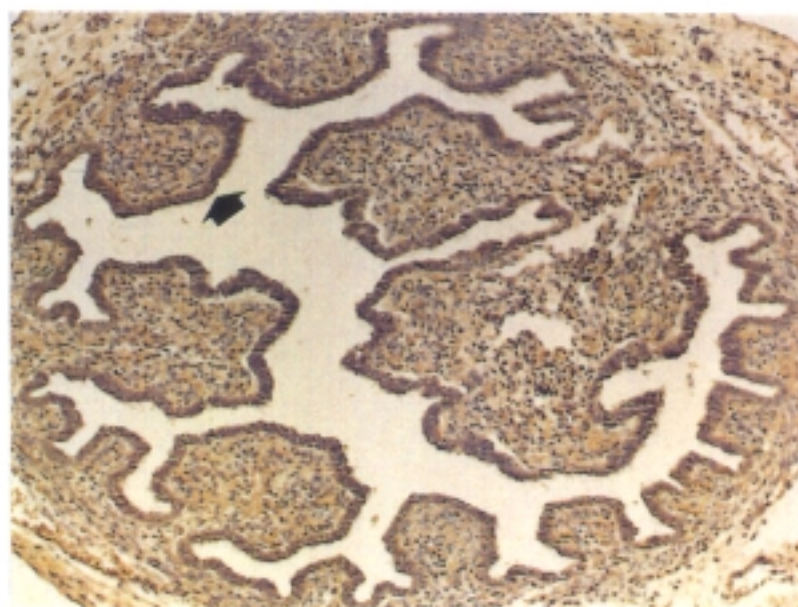
VI.1 2



A



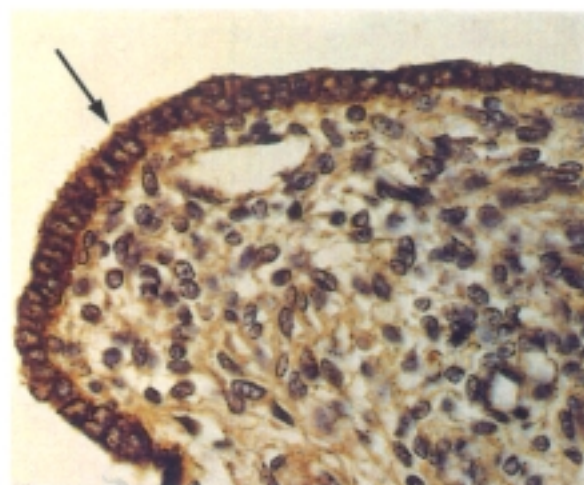
B



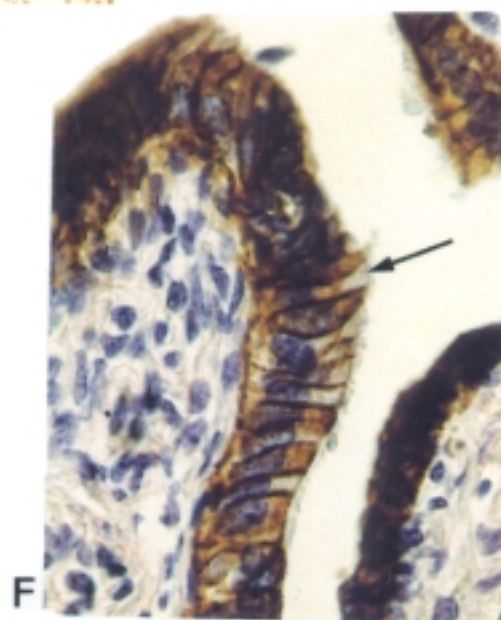
C



D



E



F

FIGURA VI. 13**A. *Inmunotinción con la VIMENTINA.***

Se observa una tinción negativa en:

(a) Trompa. (b) Endometrio. (c) Endocérnix.

Feto en parafina. (2 x).

B. *Inmunotinción con la VIMENTINA.*

Se observa una tinción negativa en. (a) Endometrio

y positiva en, (b) Estroma.

Feto en parafina. (20 x).

C. *Inmunotinción con la VIMENTINA.*

Se observa una tinción positiva en:

Epitelio de superficie ovárico, mostrando una tinción de menor intensidad que en el ovario fetal procesado en congelación.

Feto en parafina. (20 x).

D. *Inmunotinción con la VIMENTINA.*

Se observa una tinción positiva en:

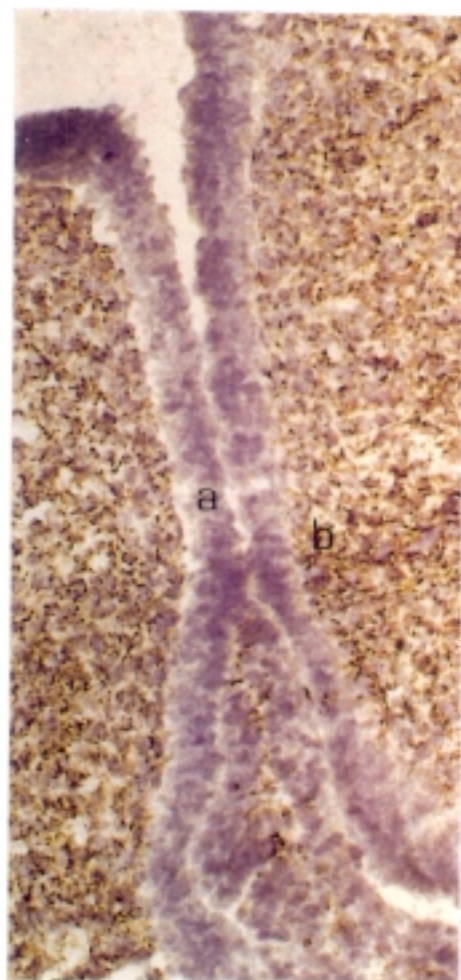
Epitelio de superficie ovárico, mostrando una tinción de mayor intensidad que en el ovario fetal procesado en parafina .

Feto en congelación. (20 x).

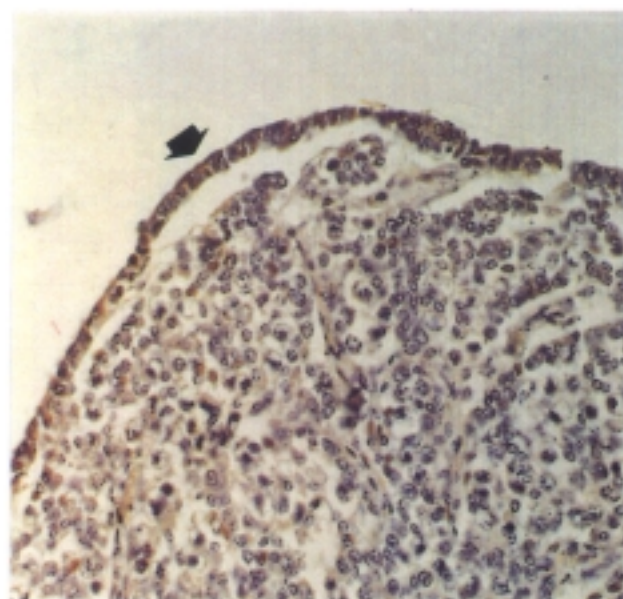
VI.13



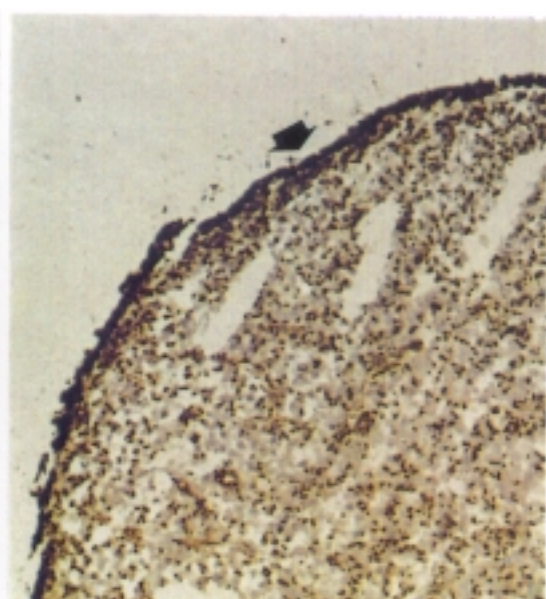
A



B



C



D

FIGURA VI. 14**A. *Inmunotinción con el EMA.***

Detalle de la tinción en adenocarcinoma de endometrio. Con una intensidad grado III, con reforzamiento en la membrana luminal, siendo la tinción menos homogénea que con el CAM 5.2. Adenocarcinoma de endometrio en parafina. (20 x).

B. *Inmunotinción con la DESMINA.*

Detalle de la tinción positiva en un mioma(a). Con una intensidad grado III. Utero de adulto en parafina. (2 x).

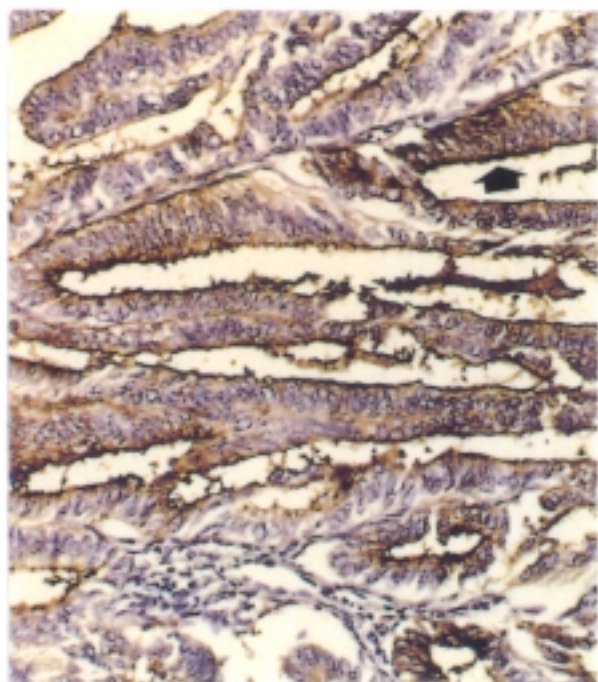
C. *Inmunotinción con la DESMINA.*

Detalle de la tinción en adenocarcinoma de endometrio. Con una intensidad grado III en el estroma(a). Las glándulas endometriales son negativas (b). Adenocarcinoma de endometrio en parafina. (1 x).

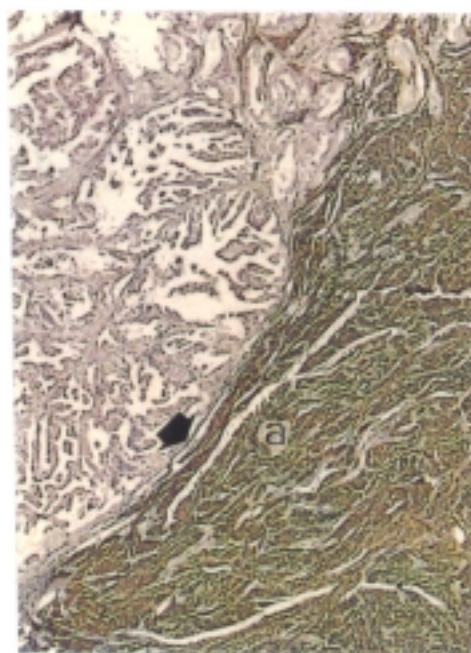
D. *Inmunotinción con el EMA.*

Detalle de la tinción en un Nido de Walthard. Con una intensidad grado I-II, con reforzamiento en la membrana citoplasmática. Ovario de adulto en parafina. (20 x).

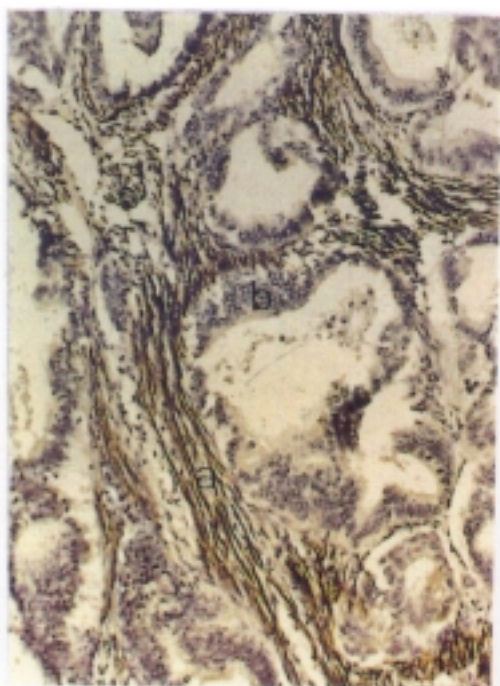
VI.14



A



B



C



D

FIGURA VI. 15**A. *Inmunotinción con el CAM 5.2.***

Con una intensidad grado III, con reforzamiento en la membrana citoplasmática, la tinción es uniforme dentro del tumor.

Adenocarcinoma mucinoso de ovario en parafina.
(4 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Adenocarcinoma mucinoso de ovario en parafina.
(20 x).

C. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Adenocarcinoma mucinoso de ovario en parafina.
(40 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

Con una intensidad grado III, sin reforzamiento en la membrana citoplasmática, la tinción es uniforme dentro del tumor.

Adenocarcinoma mucinoso de ovario en parafina.
(4 x).

E. *Inmunotinción con el EMA.*

Con una intensidad grado I-II, sin reforzamiento en la membrana citoplasmática, la tinción es focal.
Adenocarcinoma mucinoso de ovario en parafina.
(20x).

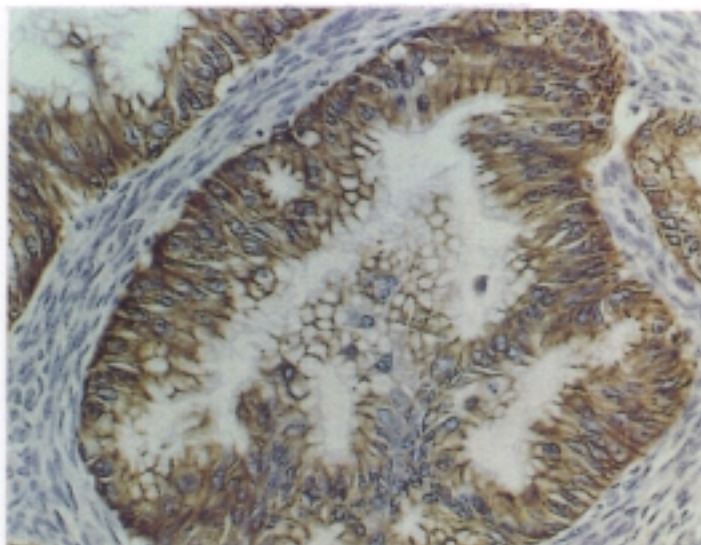
F. *Inmunotinción con el PKK1.*

Con una intensidad grado III, sin reforzamiento en la membrana citoplasmática.
Adenocarcinoma mucinoso de ovario en parafina.
(20 x).

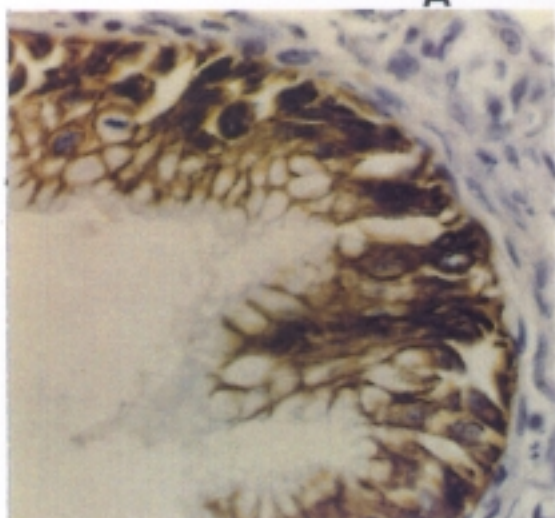
VI.15



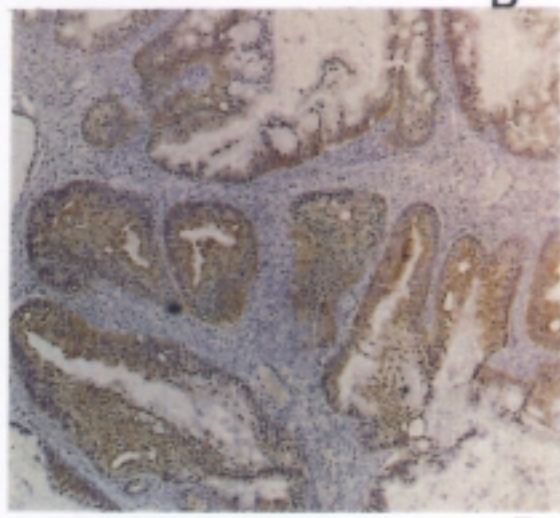
A



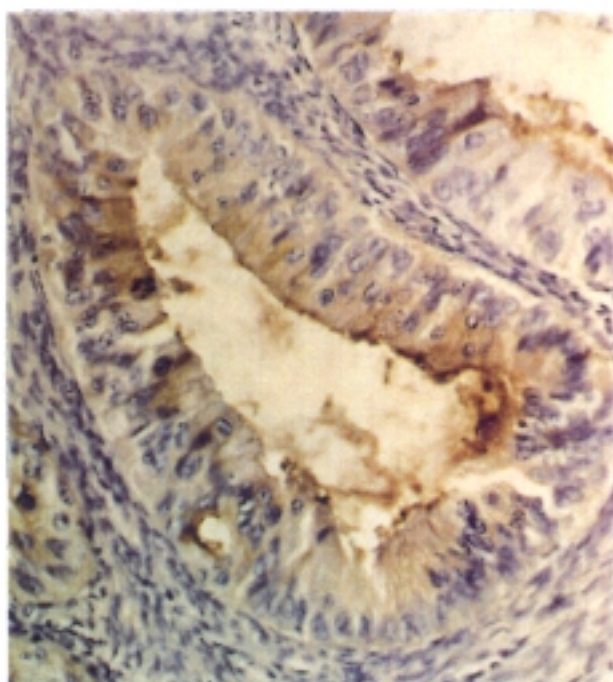
B



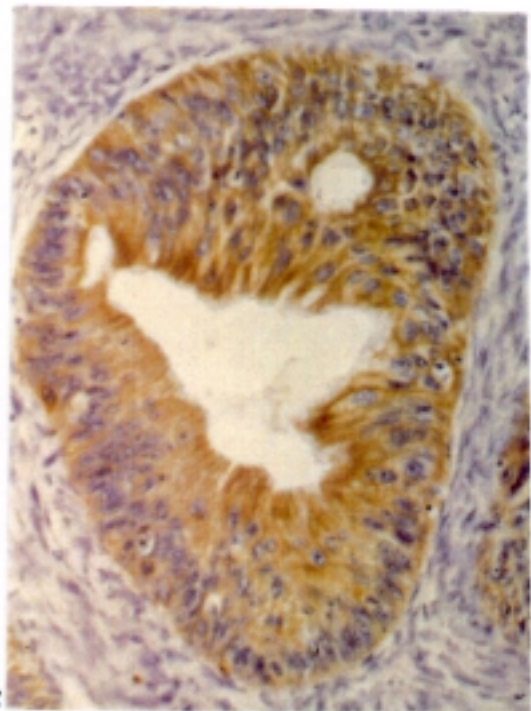
C



D



E



F

FIGURA VI. 16**A. *Inmunotinción con el CAM 5.2.***

Con una intensidad grado III, con reforzamiento en la membrana citoplasmática, la tinción no es uniforme dentro del tumor, algunas papilas son negativas para el anticuerpo.

Adenocarcinoma seroso de ovario en parafina.
(10 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5.2.*

Detalle de la inmunotinción, con una intensidad grado III, con reforzamiento en la membrana citoplasmática.

Adenocarcinoma seroso de ovario en parafina.
(40 x).

C. *Inmunotinción con el EMA.*

Con una intensidad grado III, con reforzamiento en la membrana citoplasmática basal, la tinción es homogènea dentro del tumor.

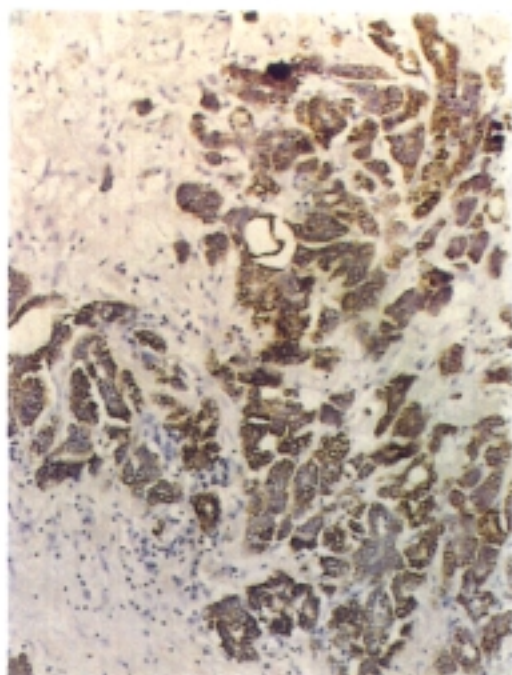
Adenocarcinoma seroso de ovario en parafina.
(20 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

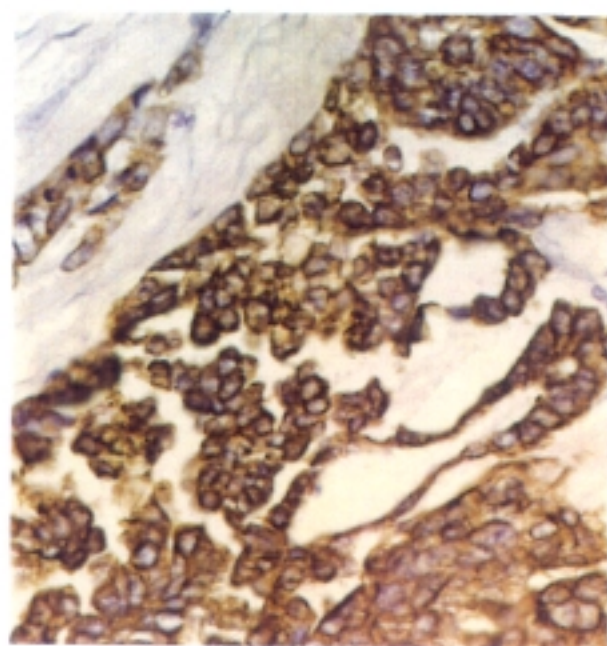
Con una intensidad grado I, con reforzamiento en la membrana citoplasmática basal, la tinción es focal dentro del tumor.

Adenocarcinoma seroso de ovario en parafina.
(40 x).

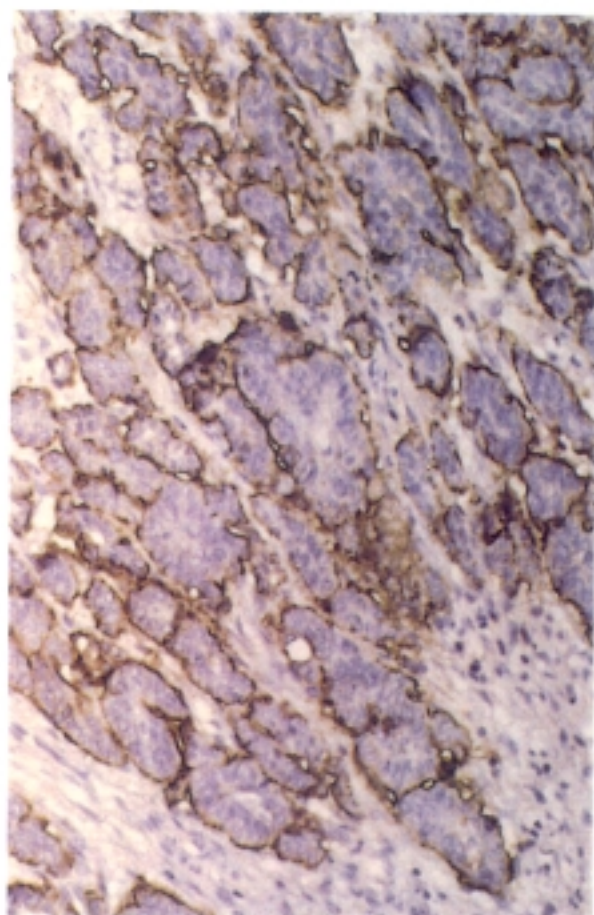
VI.16



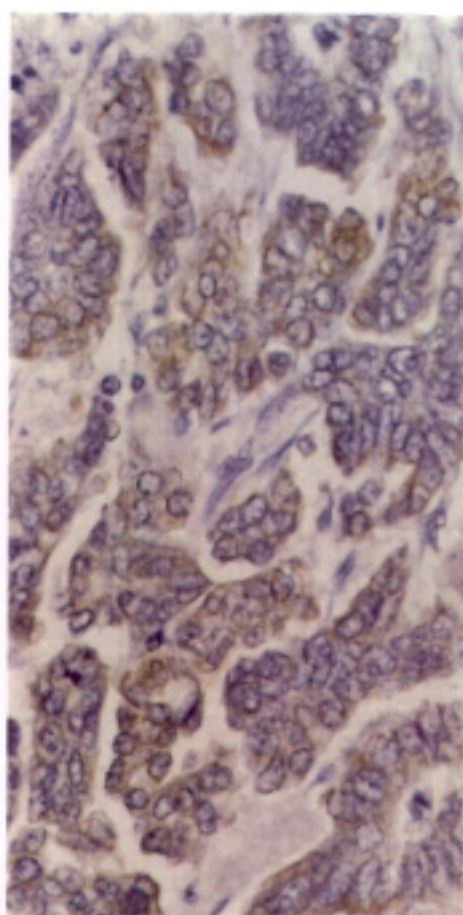
A



B



C



D

FIGURA VI. 17**A. *Inmunotinción con el EMA.***

Con una intensidad grado III, sin reforzamiento de la membrana citoplasmática.

Tumor de Células Claras del ovario, en parafina.
(20 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5. 2.*

Con una intensidad grado I, sin reforzamiento de la membrana citoplasmática, la tinción es focal
Tumor de Células Claras del ovario, en parafina.
(20 x).

C. *Inmunotinción con el CAM 5. 2.*

Con una intensidad grado I, sin reforzamiento de la membrana citoplasmática, el citoplasma aparece con un aspecto granular.

Tumor de Células Claras del ovario, en parafina.
(40 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

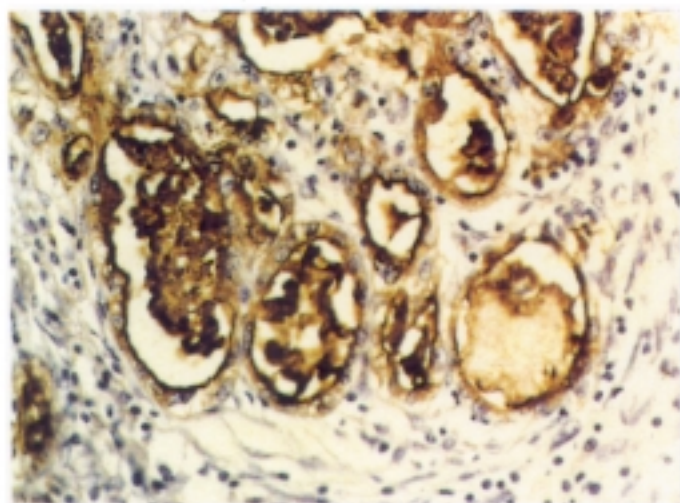
Con una intensidad grado I, con reforzamiento de la membrana citoplasmática, es mas focal que el CAM 5. 2.

Tumor de Células Claras del ovario, en parafina.
(20 x).

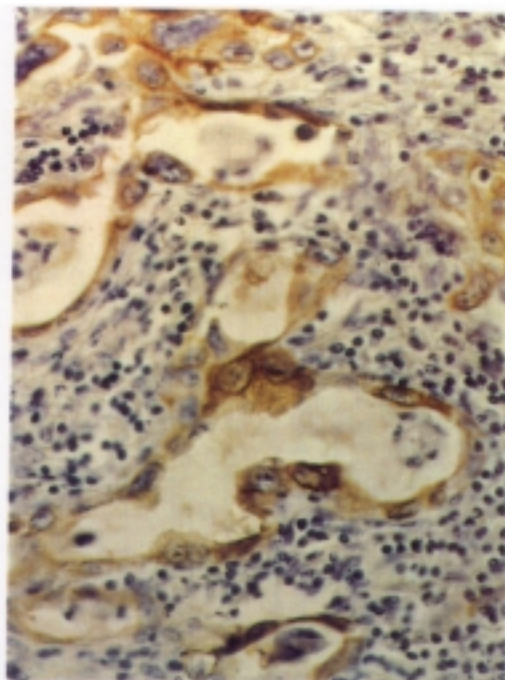
E. *Inmunotinción con el AE1/AE3.*

Tumor de Células Claras del ovario, parafina (20 x).

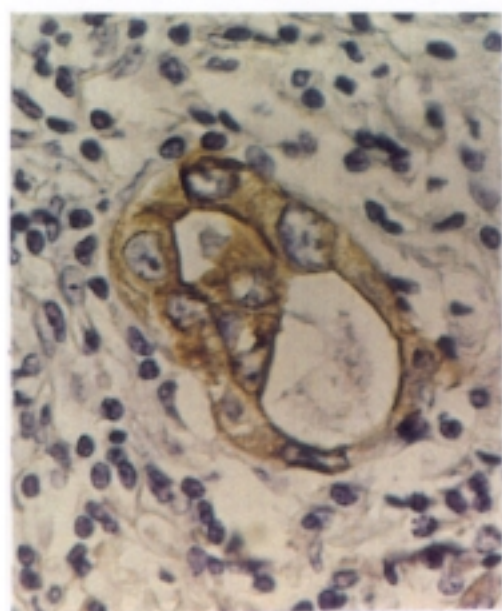
VI.17



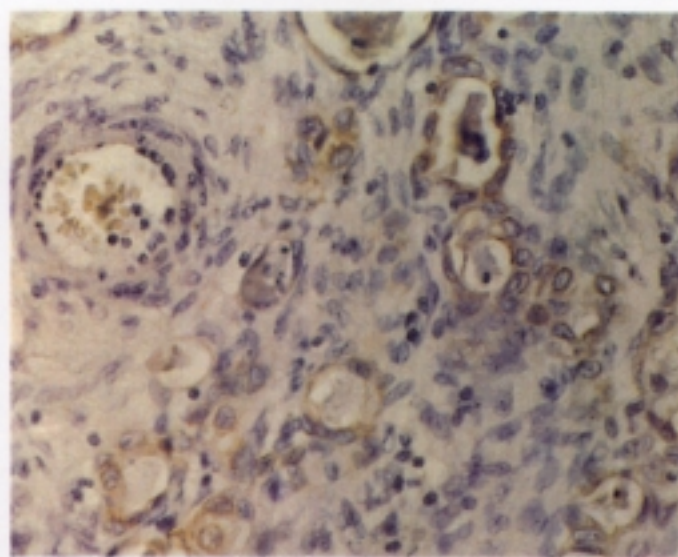
A



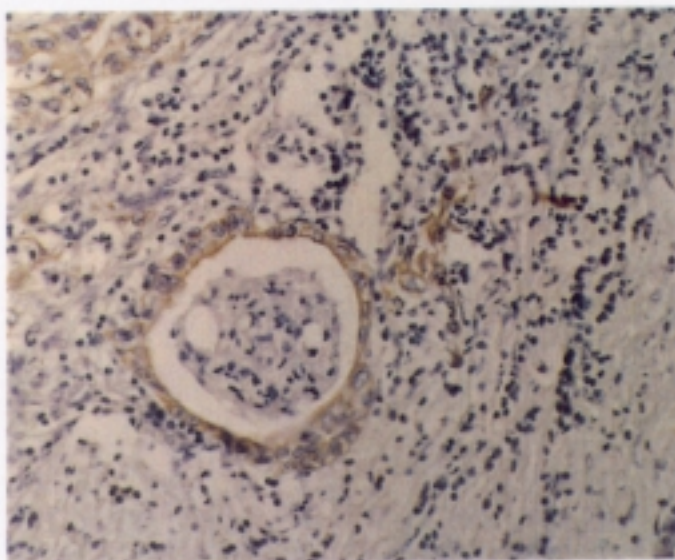
B



C



D



E

FIGURA VI. 18**A. *Inmunotinción con el CAM 5. 2.***

Con una intensidad grado III. con reforzamiento de la membrana citoplasmática. la tinción no es homogénea dentro del tumor.

Adenocarcinoma endometriode ovárico. en parafina.
(10 x).

B. *Inmunotinción con el PKK1.*

Con una intensidad grado III. con reforzamiento de la membrana citoplasmática. la tinción no es homogénea dentro del tumor.

Adenocarcinoma endometriode ovárico. en parafina.
(10 x).

C. *Inmunotinción con el EMA.*

Con una intensidad grado III. con reforzamiento de la membrana citoplasmática. la tinción es homogénea dentro del tumor. las zonas de metaplasia escamosa son negativas .

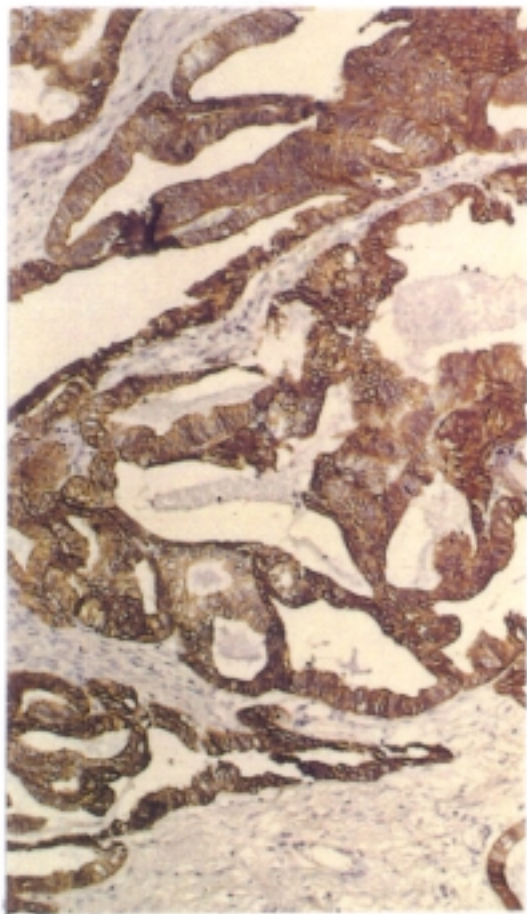
Adenocarcinoma endometriode ovárico. en parafina.
(20 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

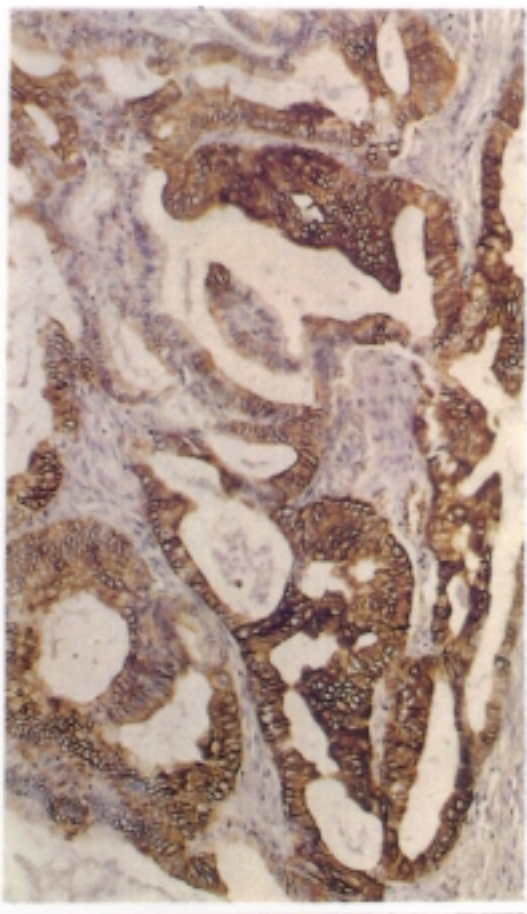
Con una intensidad grado III. con reforzamiento de la membrana citoplasmática. la tinción no es homogénea dentro del tumor. las zonas de metaplasia escamosa son positivas.

Adenocarcinoma endometriode ovárico. en parafina.
(10 x).

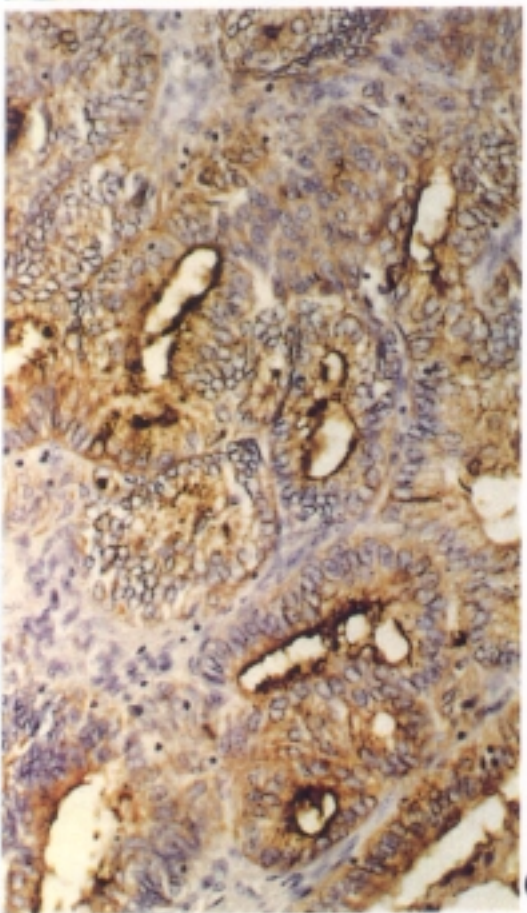
VI.18



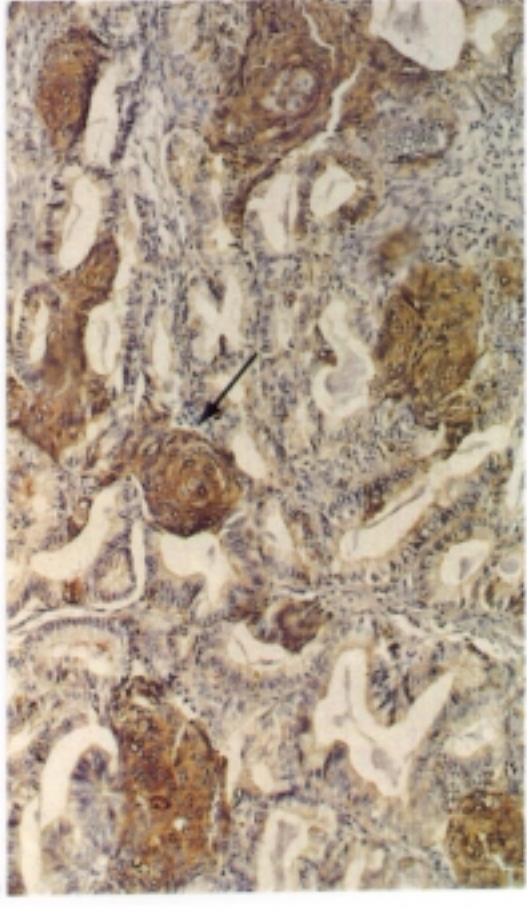
A



B



C



D

FIGURA VI. 19**A. *Inmunotinción con el CAM 5. 2.***

No se tiñe el material intraluminal. se observa reforzamiento de las membranas que rodean el lumen.

Tumor de Brenner. en parafina. (40 x).

B. *Inmunotinción con el CAM 5. 2.*

Tumor de Brenner. en parafina. (10 x).

C. *Inmunotinción con el PKK1.*

No se tiñe el material intraluminal. se observa reforzamiento de las membranas que rodean el lumen. La tinción tiene una intensidad grado II. Tumor de Brenner. en parafina. (20 x).

D. *Inmunotinción con el PKK1.*

Tumor de Brenner. en parafina. (10 x).

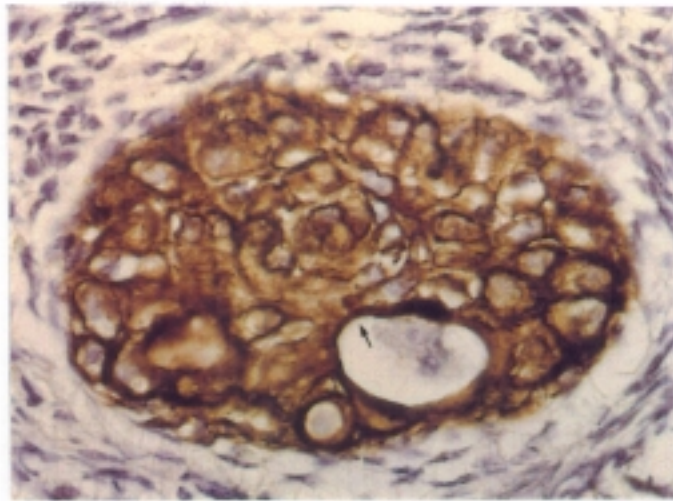
E. *Inmunotinción con el AE1/AE3.*

No se tiñe el material intraluminal. La tinción tiene una intensidad grado I. Tumor de Brenner. en parafina. (40 x).

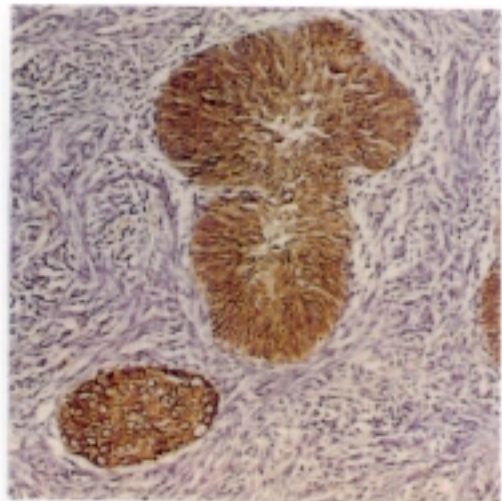
F. *Inmunotinción con el EMA.*

Se observa una tinción intensamente positiva en la zona central de los nidos tumorales. con tinción del material intraluminal. y reforzamiento de las membranas que rodean el lumen. Tumor de Brenner. en parafina. (20 x).

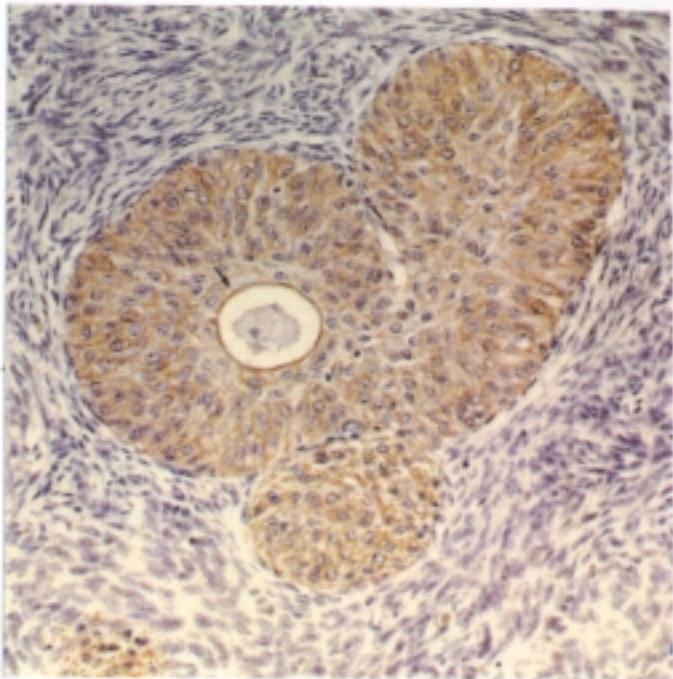
VI.19



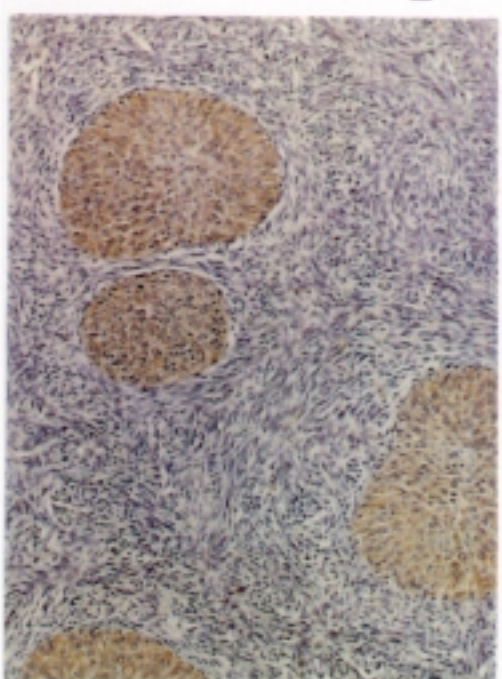
A



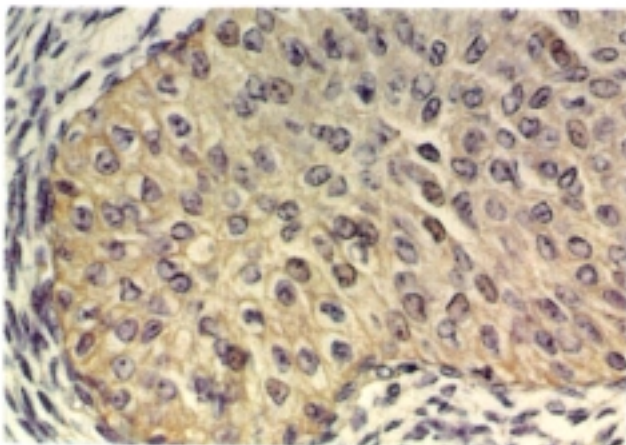
B



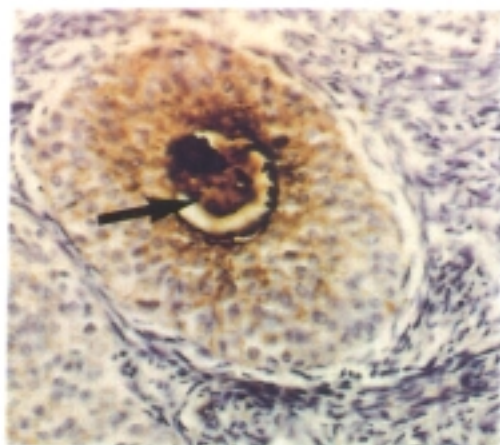
C



D



E



F

CAPITULO VII

DISCUSION

DISCUSION

La habilidad para demostrar las keratinas en las diferentes neoplasias derivadas de epitelios no keratinizados, varían en las diferentes publicaciones y parece que estos hallazgos diferentes pueden estar en relación con las técnicas empleadas.

Los hallazgos en nuestro trabajo con las keratinas y con el EMA han sido positivos en todos los casos de tumores epiteliales, utilizando tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, y utilizando como tratamiento enzimático la tripsinización.

La intensidad de tinción en estos tumores ha variado de unos casos a otros y en algunos ha sido de forma focal. Sólo con el anticuerpo monoclonal AE1/AE3 encontramos positividad exclusivamente en el tumor de células claras, y no en el resto de los tumores epiteliales.

Por lo tanto, en nuestra experiencia los resultados con tumores epiteliales ováricos en parafina y con la técnica del PAP, utilizando tripsinización son útiles cuando se estudian anticuerpos como el CAM 5.2., PKK1 y el EMA, lo que facilita la utilización de estos anticuerpos en estudios retrospectivos, en los que se utiliza habitualmente tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, no siendo necesaria la utilización de tejidos en congelación para el estudio de estos tumores con estos marcadores antigénicos en tumores epiteliales ováricos.

Esto apoya lo publicado por Nagle (180), que presenta el método del PAP como más sensible que otros métodos (protein-A-peroxidasa, peroxidasa indirecta o avidina-biotina-peroxidasa) en investigaciones realizadas en tumores ováricos.

Nuestros trabajos están en desacuerdo con lo publicado por Gangei et al (95), que publica que sólo el tumor de Brenner contiene keratinas en contra de la negatividad de otros 27 tumores epiteliales estudiados, utilizando este autor tejidos en parafina y técnica del PAP.

Como ya apunta Nagle (180), puede ser que en algunos de los casos la intensidad de la tinción fuera débil y se hubieran considerado los casos como negativos.

La fijación en formol y los tejidos incluidos en parafina en general se pueden utilizar con buenos resultados (10), (180), (167), si se realiza correctamente la técnica, y se realizan técnicas para degradar las uniones que enmascaran a veces los antígenos. Para esto podemos utilizar diversos tratamientos enzimáticos con tripsina, pronasa o pepsina (127) (180).

Hay autores que han sugerido que el ethanol absoluto (10) o la solución de Bouin (158) son superiores a la fijación con formol.

Problemas en el proceso de fijación o en el tratamiento enzimático inadecuado de los tejidos pueden ser la causa de no demostración de citokeratinas en trabajos en tumores epiteliales reportados por algunos autores (95), (9), (81).

Respecto a la posibilidad de utilizar tanto tejidos en congelación como en parafina para la investigación de los anticuerpos empleados en nuestro estudio ,hemos encontrado diferencias respecto a las posibilidades de utilización que informan las casas comerciales.

Los diferentes laboratorios que comercializan estos anticuerpos refieren que salvo los anticuerpos URO y el Ki 67 el resto de los anticuerpos utilizados en nuestro estudio se pueden emplear siempre tanto en congelación como en parafina.

De nuestra experiencia con este trabajo concluimos que para la Desmina, se obtienen buenos resultados tanto en congelación como en parafina.

A diferencia de la Desmina, para la investigación del PKK1, del EMA, y del CAM 5.2 en tejidos fetales se deberían utilizar tejidos en congelación y no en parafina, ya que con la parafina se obtienen tinciones débiles y en algunos casos negativas, y por otra parte las patrones de tinción celulares se reconocen de manera incompleta. Estos hechos pueden llevar a

obtener resultados falsamente negativos en un tejido, aunque se utilice tripsinización.

En la investigación con la Vimentina hemos encontrado menores expresiones positivas que la mayoría de los autores que han utilizado técnicas diferentes a la del PAP. Los resultados comparativamente son mejores en autores que han utilizado técnicas de inmunofluorescencia o avidina-biotina. Los resultados de la literatura y de nuestro trabajo también son mejores en congelación que en parafina. De estos datos se podría deducir que el PAP y los tejidos incluidos en parafina no son la mejor metodología para el estudio de este anticuerpo, tanto en feto como en adulto.

Respecto a los otros antígenos tisulares asociados investigados en nuestro estudio, S-100, AFP, alfa-1-antitripsina, antígeno H del grupo sanguíneo y Factor VIII, no hemos encontrado diferencias respecto a utilizar tejidos en congelación o en parafina.

Tanto con el Ki 67 y con los anticuerpos URO se han obtenido buenos resultados en los tejidos en congelación fetales.

* A continuación pasaremos a comentar los hallazgos en este trabajo obtenidos con inmunotinciones con la VIMENTINA.

Se ha encontrado expresión para la vimentina utilizando el método del PAP en el epitelio ovárico en feto, tanto en parafina como en congelación, así como en el epitelio ovárico adulto en congelación.

No se ha encontrado expresión positiva de la vimentina en el resto de los epitelios del tracto genital femenino, ni en fetos ni en adultos.

En ninguno de los tumores epiteliales ováricos estudiados se ha encontrado expresión positiva para la vimentina.

En el ovario adulto en parafina se ha encontrado tinción positiva en las células de la granulosa, de forma focal y en las células de la teca.

En los fetos hemos observado inmunotinción positiva en células estromales interpretadas como células de la pregranulosa con el CAM 5.2., pero no se ha observado en estas células coexpresión con la Vimentina.

Los datos sobre la expresión de la vimentina en los epitelios del tracto genital femenino, así como su expresión en el tejido neoplásico y en las células de la granulosa y de la teca, no son homogéneos en la literatura revisada.

Nuestros hallazgos coinciden con los de Miettinen (168) (169) y Benjamin (19), en la expresión de la vimentina tanto en las células de la teca como en las de la granulosa, difiriendo de la negatividad para las keretinas en las células de la granulosa publicado por Miettinen. En nuestro trabajo, de acuerdo con las hallazgos de Benjamin se encuentra expresión del CAM 5.2. en las células de la granulosa y no en las de la teca.

Nuestro trabajo difiere también de lo publicado Franke (88) sobre la negatividad de la vimentina en las células de la granulosa así como la negatividad de las keratinas en estas células.

Czernoblisky 1985 (59), publica solo expresión positiva de la vimentina en las células de la granulosa en el adulto para la vimentina pero no en las células de la teca.

Aunque en nuestro trabajo encontramos células de pregranulosa positivas para el CAM 5.2., en el feto, pero no positivas para la vimentina.

Coincide también nuestros hallazgos con los de estos autores en la coexpresión de las células de la granulosa del CAM 5.2. y no así en las células de la teca. Coincidiendo también la coexpresión de estos dos anticuerpos en el epitelio ovárico de superficie.

Benjamín (19), Dabbs (64) (194), y otros autores (168) y (59) encuentran también expresión positiva de la vimentina en el epitelio ovárico. Aunque Benjamín no encuentra estos resultados de forma absolutamente homogénea encontrando positividad 8/11 casos en el epitelio ovárico utilizando tejidos en parafina y con técnica de inmunoperoxidasa indirecta.

En nuestro estudio la positividad para la vimentina en el epitelio de superficie ovárico ha sido constante en los doce casos estudiados en fetos en parafina y en congelación y en el epitelio ovárico adulto utilizando tejido en congelación. En los casos estudiados en ovario adulto en parafina con la técnica empleada no se consigue demostrar la vimentina en contra de la positividad obtenida cuando se utilizan tejidos en congelación.

De nuestro trabajo se puede concluir que los tejidos en parafina en el ovario adulto, con la técnica del PAP, y aún utilizando tripsinización no son un buen material para la investigación de la vimentina en el epitelio ovárico normal, dado que puede dar lugar a resultado falsamente negativos, que se obvian utilizando tejidos en congelación.

Del hecho de que en los fetos en parafina sí se puedan observar positividad para la vimentina en el epitelio ovárico de superficie, aunque con menos intensidad que cuando se investiga en tejidos fetales en congelación (intensidad en grado I en parafina, frente a una intensidad de grado III en congelación), y que en cambio en el adulto en parafina empleando la misma técnica no se puede demostrar la vimentina, pero sí en el ovario adulto en congelación nos lleva a sacar la conclusión de que quizá el epitelio fetal ovárico nos lleva a expresar la vimentina con mayor intensidad que el adulto.

Respecto a la expresión de la vimentina en tumores epiteliales ováricos no se han encontrado en este trabajo expresión de la vimentina en ninguno de los tumores epiteliales estudiados, estos hallazgos de nuestro trabajo coinciden con los publicados por Ramaekers 1982 (194), que publica ausencia de

vimentina en tumores de Brenner y en el cistoadenocarcinoma seroso papilar.

Nuestros hallazgos de la expresión negativa de la vimentina en tumores epiteliales ováricos no coinciden por lo publicado por Dabbs 1988 (65), que publica la coexpresión de la vimentina y de keratinas en el 42% de los carcinomas serosos, en el 41% de los tumores endometrioides y en el 7% en los tumores de células claras, refiriendo este autor que la expresión de la vimentina en los tumores serosos es sólo focal apareciendo únicamente en el 20% del tejidos.

Las publicaciones sobre la expresión de la vimentina en los tumores serosos son contradictorios refiriendo autores como Ramaekers 1982, Bonazzi 1983 y Czernobilsky 1984 no detección de la vimentina en estos tumores en contra de lo referido por Dabbs (65).

Dabbs en otro trabajo en 1986 (64) publica encontrar las células del carcinoma de endometrio y del tumor endometriode ovárico positivas para la vimentina.

Difieren nuestros resultados de los de Miettinen que publica en 1983 (168) expresión positiva de la vimentina en algunos carcinomas epiteliales ováricos. Aunque este mismo autor en un trabajo posterior 1985 (169) concluye que los anticuerpos para la vimentina y para las citokeratinas serían útiles para la diferenciación entre tumores de la granulosa y tumores de origen epitelial en el ovario.

Varios autores han realizado trabajos con vimentina y citokeratinas, para intentar su utilización como marcadores en el diagnóstico diferencial entre tumores de la granulosa y tumores de origen epitelial, como Benjamin (19) y Miettinen (168) (169).

Los resultados son contradictorios ya que Miettinen no encuentra expresión de las citokeratinas en células de la granulosa ni en tumores de la granulosa, en contra de lo publicado por Benjamin que encuentra expresión positiva del CAM 5.2. y de la vimentina tanto en células de la granulosa en el feto, en el adulto y en los tumores de la granulosa (aunque en

este tumor la expresión de la keratina no aparece de forma constante). Nuestros hallazgos coinciden con los de Benjamin en la coexpresión de la vimentina y del CAM 5.2 en las células de la granulosa en el adulto y en la superficie epitelial ovárica.

De estos resultados se puede concluir que la presencia de ambos tipos de filamentos intermedios tanto en tumores epiteliales como en tumores de la granulosa resten valor a su utilización en el diagnóstico diferencial de ambos tipos de tumores, aunque la presencia de vimentina y no de citokeratinas apoyen el diagnóstico de tumor de células de la granulosa y que la presencia de citokeratinas y no de vimentina puede ayudar en el diagnóstico de un tumor de origen epitelial.

La utilización de ambos marcadores (vimentina y CAM 5.2.) también se ha empleado para intentar resolver el problema de la histogénesis de las células de la granulosa dado que algunos embriólogos están a favor del origen de las células de la granulosa en el epitelio celómico, viendo el origen de estas células otros autores en el mesénquima gonadal (207).

Los hallazgos sobre las citokeratinas tanto en nuestro trabajo como en lo referido por Benjamin sería una evidencia a favor de su naturaleza epitelial.

Aunque estos hallazgos no resuelven el origen de estas células dada la coexpresión en células de la granulosa, de vimentina y citokeratinas, coexpresión que también encontramos en el epitelio ovárico y en cultivos de células epiteliales (92) (90) (167).

Por tanto no es posible deducir de la expresión de estos marcadores una relación entre las células de la granulosa del epitelio ovárico.

Aunque de la experiencia de este estudio, que coincide con los hallazgos de Benjamin si que se puede concluir una diferencia antigénica entre las células de la teca y de la granulosa, expresando las primeras vimentina pero no keratinas.

En las preparaciones se han encontrado positividad en las células endoteliales y en las células musculares lisas del tejido vascular, como ya había sido descrito (91) (92).

Así mismo coinciden nuestros hallazgos por lo descrito (88) respecto a la positividad de la vimentina para el estroma en el miometrio, también coincidiendo nuestros resultados de tinción positiva de los miomas sólo con la desmina y no con la vimentina.

Se ha publicado que en algunos carcinomas el componente estromal se tiñe con la vimentina (Moll (172)), aunque en este trabajo de Moll no se hace referencia expresa a que esto ocurra en tumores epiteliales ováricos.

En nuestros resultados el estroma de los tumores epiteliales no se tiñe en ningún caso, en contra de la positividad que encuentran en la tinción del estroma en el tumor de Brenner y en el tumor de células claras Ramaekers et al (194), aunque en este trabajo de Ramaekers se utilizan tejidos en congelación y técnica de inmunofluorescencia, a diferencia de nuestro trabajo en el que se utilizan tejidos epiteliales en parafina y la técnica del PAP.

También encuentra positividad para la vimentina en el estroma del tumor de Brenner, Santini (203) utilizando tejidos en parafina y con técnicas de avidina-biotina.

Lifschitz-Mercer (157) también publica la positividad para la vimentina del estroma en el tumor de Brenner con técnicas de inmunofluorescencia. * En nuestro trabajo encontramos una diferencia en el comportamiento del estroma del endometrio normal, siendo negativo para la vimentina, apareciendo en cambio positividad en el estroma del adenocarcinoma de endometrio. A este respecto no se ha encontrado ninguna referencia en la literatura.

Estas diferencias en los hallazgos para las positividades de la vimentina es posible que se deban al tipo de material empleado, apoyando lo ya expresado anteriormente de mejores resultados obtenidos cuando se utilizan tejidos en congelación. Aunque es probable que el PAP no sea la mejor técnica en parafina para identificar la vimentina, dado, como ya hemos referido otros

autores encuentran resultados positivos utilizando técnicas de avidina-biotina o inmunofluorescencia.

Nuestros hallazgos coinciden con los publicados por Franke en cuanto a la negatividad de la vimentina y la trompa y el endometrio.

En resumen:

- Nuestros hallazgos coinciden con los de Benjamin (19), Miettinen (168) (169), Bast (16) y Stamp (21) en la expresión de la vimentina en el epitelio ovárico tanto fetal como adulto y en las células de la granulosa y de la teca.
- Nuestros hallazgos difieren de lo publicado por Franke (88) sobre la negatividad de la vimentina en las células de la granulosa (trabajo realizado en ovarios de ratas).
- Nuestros hallazgos no coinciden con la no expresión de la vimentina en el epitelio ovárico publicado por Miettinen (167).
- En nuestras preparaciones no encontramos expresión de la vimentina en los tumores epiteliales ováricos en parafina utilizando la técnica del PAP.

Estando estos hallazgos en concordancia con lo publicado por Ramaekers en el tumor de Brenner y en el adenocarcinoma seroso papilar (194), y en discordancia por la positividad publicada por Santini (203) y por Lifschitz-Mercer (157).

Lo que nos lleva a concluir que la parafina y el PAP probablemente no sean la mejor forma de conservación de los tejidos ni la mejor técnica para la demostración de la vimentina ni en el estroma ni en los epitelios.

* Pasaremos a discutir los hallazgos encontrados en nuestro trabajo respecto a la

DESMINA

En nuestras inmunotinciones con la desmina hemos encontrado negatividad en la expresión de la misma en todos los epitelios del tracto genital femenino, tanto en el adulto como en el feto.

Los resultados han sido iguales para las preparaciones en congelación y las de parafina.

Respecto al estroma se encuentra una tinción débil en el estroma ovárico fetal, apareciendo este más intenso en congelación que en parafina (Grado II/Grado I). No encontramos tinción en el estroma en el ovario adulto.

En la trompa aparece teñido el estroma tanto en el feto como en el adulto apareciendo la tinción en el estroma de la trompa adulta más intensa que la fetal.

En el endometrio aparece teñido el estroma en el feto a diferencia de la tinción negativa en el adulto.

En el cérvix no encontramos expresión positiva para la desmina ni en el feto ni en el adulto, en el estroma.

Se observa una positividad en las células del miometrio marcando una clara positividad en los fibroleiomiomas, en los que encontramos esta tinción positiva para la desmina y una expresión negativa para la vimentina.

En el estroma del miométrio aparece una tinción positiva más intensa cuanto más se acerca a la superficie del útero, esta observación es similar en el feto y en el adulto.

En la trompa encontramos una tinción positiva en ambas capas de la muscular, observándose un patrón de la tinción idéntico en ambas. De autocontrol en las preparaciones se han utilizado las tinciones de las células musculares lisas del tejido muscular en el tejido adulto no apareciendo esta tinción en el tejido fetal.

Respecto a las diferencias en los tejidos en congelación y en parafina, encontramos que no hay variación en cuanto a los

resultados entre ambos tipos de tejidos, aunque las intensidades son menores cuando se utiliza parafina.

Estos resultados en cuanto al tipo de tejido empleado coinciden con lo publicado por Wang (127).

Nuestros resultados coinciden con lo publicado, aunque hay pocas referencias sobre la expresión de este anticuerpo en el tejido del tracto genital femenino.

Se encuentra una tinción positiva en el músculo liso del tracto genital femenino como publican otros autores (248) (172) (47), constatando en nuestro trabajo esta expresión desde el tejido fetal hasta el adulto así como en el leiomioma.

Nuestros datos aportan a lo ya conocido el que esta expresión aparece desde el tejido fetal, permaneciendo en la vida adulta y en el desarrollo tumoral tanto benigno como maligno, como ya han publicado Virtanen (248), Moll (172), Cooper (47) y Franke (88).

Respecto a la expresión en el músculo liso del tejido vascular, no encontramos esta expresión en el feto, encontrándose en el adulto, de lo que se puede concluir, que probablemente la expresión de la desmina en el feto es más débil, no pudiéndose hacer evidente con las técnicas empleadas o que aparece más tarde en la evolución.

Sobre esta posibilidad de la expresión más tardía de la desmina en el desarrollo encontramos una referencia de Franke (91).

Esta negatividad en el músculo liso del tejido vascular está descrita como permanente en la vida adulta en el músculo de la aorta.

La negatividad para los epitelios genitales coincide con la negatividad de los epitelios del tracto urinario publicados por Cordon Cardo (50).

Las tinciones positivas encontradas en el leiomioma estudiado también coincide por lo expresado por Gabbiani 1981 (94).

En los nidos de Walthard estudiados la expresión para la desmina es negativa, no habiendo encontrado en la bibliografía revisada ninguna referencia a este respecto.

La negatividad de la desmina para las células de la granulosa tanto en el feto como en el adulto coinciden con lo publicado por Benjamín (19) en ovarios fetales y adultos, así como en tumores de la granulosa.

Respecto a los hallazgos en tumores epiteliales hemos encontrado que ninguna de las células tumorales de los tumores epiteliales estudiados expresan la desmina, en las células epiteliales.

Encontramos una tinción positiva en el estroma para la desmina solo en el tumor de Brenner, coincidiendo este hallazgo con lo objetivado por Ramaekers 1983 (195) y por Santini (203) sobre la positividad del estroma en dicho tumor.

Estos datos apuntan una diferencia del tumor de Brenner respecto al resto de los tumores epiteliales en el comportamiento del tejido estromal.

Bonazzi (47) encuentra positividad en el estroma en tumores sarcomatosos del ovario y del endometrio.

En resumen nuestros hallazgos coinciden con lo publicado respecto a la desmina en el aparato genital.

Es de reseñar el hecho de la expresión de la desmina en el ovario fetal, la desaparición de la misma en el ovario adulto y la reaparición de esta expresión en el caso del tumor de Brenner, así como la no expresión de la desmina en los tractos musculares del tejido vascular en el feto.

También aportamos el hecho de la no expresión de la desmina en los nidos de Walthard, sobre lo que no hemos encontrado ninguna otra referencia.

* Comentaremos ahora los hallazgos de nuestro trabajo con diferentes citokeratina, comenzando con lo obtenido en las inmunotinciones con el AE1/AE3.

- Los antígenos estudiados con el anticuerpo monoclonal AE1/AE3 no se expresan con el tejido fetal.
- En el tejido adulto estudiado, en parafina, solo aparece expresión positiva de este anticuerpo en el epitelio ovárico. No aparece expresión para el AE1/AE3 ni en el endometrio, ni en la trompa, ni en el cervix.
- En los tumores ováricos estudiados aparece una expresión positiva de intensidad Grado I, en el tumor de Brenner y en el adenocarcinoma de células claras. No se ha observado diferencia en el patrón o en la intensidad de la tinción según el grado de diferenciación de estos tumores.
- En el adenocarcinoma del endometrio se ha observado una tinción negativa en las glándulas tumorales, apareciendo como positiva las zonas de metaplasia escamosa con una intensidad de Grado I.

Aunque se han realizado muchos trabajos de investigación con citokeratinas en epitelios humanos son escasas las diferencias encontradas para este anticuerpo comercializado, AE1/AE3.

Este anticuerpo reconoce un espectro de keratinas de (50 Kd., 56.5 Kd., 58 Kd. y 65-67Kd.). Tseng 1982 (237) publica la utilidad de este anticuerpo en la identificación de células epiteliales con gran fiabilidad.

Nuestros resultados apuntan que el espectro reconocido de keratinas por este anticuerpo monoclonal tiene una expresión muy reducida en las células epiteliales del aparato genital interno femenino así como en los tumores epiteliales.

De nuestra experiencia con el panel de anticuerpos que reconocen citokeratinas o antígenos de membrana estudiados con el CAM 5.2, PKK1 y el EMA encontramos que en nuestra experiencia estos tres anticuerpos son mejores marcadores para el

reconocimiento de los epitelios del tracto genital femenino que el anticuerpo AE1/AE3.

Nuestros resultados no coinciden con lo publicado por Franke, utilizando anticuerpos contra keratinas de la epidermis del estrato córneo (aunque este autor utiliza preparaciones originales y no este anticuerpo comercial) encontrando positividad en los epitelios del tracto genital femenino y adulto con anticuerpos que reconoce un espectro de citokeratinas similar al del AE1/AE3.

Coinciden nuestros hallazgos con lo publicado por Ramaekers (194) respecto a la expresión positiva del AE1/AE3 en el tumor de Brenner, no coincidiendo nuestros resultados negativos en el carcinoma seroso papilar con la positividad observada por este autor en dicho tumor.

Dabbs 1988 (65) utilizando este mismo anticuerpo monoclonal en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina encuentra resultados diferentes a los nuestros, ya que este autor constata la expresión positiva del mismo en todos los tumores epiteliales.

Las diferencias encontradas entre los hallazgos de Dabbs y los de nuestro trabajo podrían explicarse, bien por la no homogeneidad en la expresión en los tumores epiteliales de estas citokeratinas o bien porque los resultados pudieran estar influenciados por el tratamiento enzimático utilizado. Dabbs en su trabajo utiliza como tratamiento enzimático la pronasa y nosotros hemos utilizado la tripsina.

En nuestro trabajo sólo se ha objetivado positividad en el epitelio adulto ovárico, así como en las zonas de metaplasia escamosa en el carcinoma de endometrio, no observándose esta positividad en las zonas de metaplasia escamosa en el carcinoma endometrioides ovárico. Constatamos el hecho de la diferencia de la expresión de estas citokeratinas demostradas por el anticuerpo AE1/AE3 respecto del tumor de células claras y el tumor de Brenner, que sí las expresan, respecto al resto de los tumores epiteliales ováricos.

La tinción que encontramos en estos tumores es fundamentalmente de membrana.

De acuerdo con nuestros hallazgos encontramos la referencia de Aguirre (3) que publica la expresión positiva de este anticuerpo en el 40% de los tumores de células claras, no haciendo referencia este autor a la expresión en el resto de los tumores epiteliales ováricos, aunque sí refiere positividad en 3 sobre 15 tumores de la granulosa y en el 100% de los tumores de células de Sertoly.

De nuestros resultados se puede concluir que existe una diferencia en el patrón de citokeratinas entre los diferentes tumores de un mismo origen epitelial así como el que no hay diferencias en su expresión según el grado de diferenciación del tumor.

A continuación presentamos la Tabla VII.1 que resume la expresión de las keratinas encontradas en los tumores epiteliales ováricos.

TABLA VII. 1

EXPRESION DE LAS CITOKERATINAS Y EL EMA EN LOS TUMORES EPITELIALES OVARICOS

	AE1/AE3	PKK1	EMA	CAM.5.2.
A. Ca. C. Claras	P(I)	P(I)f	P(III)	P(I)
A. Ca. Endometrioides	N	P(III)f	P(III)	P(III)
Tumor de Brenner	P(I)	P(II)	P(I)	P(III)
A. Ca. Papilar Seroso	N	P(I)f	P(III)	P(III)f
A. Ca. Mucinoso	N	P(III)	P(I)f	P(III)

Nota: (I) Positivo d.bil; (II) Positivo moderado; (III) Positivo intenso.f = Focal

* Con el CAM 5.2. encontramos una reacción intensamente positiva en todos los epitelios del tracto genital femenino en el feto.

Se observa una diferencia en la intensidad de las tinciones según se utilicen tejidos en parafina o tejidos en congelación. Las tinciones son más débiles en parafina y mucho más intensas en tejidos en congelación.

Concluimos de nuestro trabajo que este anticuerpo en el feto se debe utilizar en tejidos en congelación pues los resultados débiles o en algunos caso incluso entre débil y negativo en parafina pueden dar lugar a resultados falsamente negativos.

En la trompa fetal encontramos que este anticuerpo marca el epitelio con una intensidad Grado II. La intensidad encontrada en la tinción con el EMA y con el PKK 1 es más intensa Grado III. así como más homogénea. concluyendo que la expresión

de los antígenos reconocidos por estos dos anticuerpos es más intensa en la trompa fetal que los antígenos reconocidos por el CAM 5.2.

En el tejido adulto en el ovario aparece la misma intensidad y patrón de tinción en el epitelio de superficie tanto si utilizamos tejidos en parafina como en congelación. De lo expuesto resumimos que en el adulto se pueden emplear ambos tipos de tejidos para la investigación de este anticuerpo.

En el endometrio encontramos que el CAM 5.2 se comporta como un marcador oncofetal, ya que aparece como positivo en el endometrio fetal, desaparece la expresión del mismo en el endometrio adulto y reaparece en el adenocarcinoma de endometrio.

Los patrones de tinción encontrados por este anticuerpo son los siguientes: encontramos tinción positiva tanto para el citoplasma como para la membrana, aunque la membrana en todos los casos se tiñe de forma más intensa que el citoplasma. En las membranas del epitelio tubárico se encuentra un reforzamiento en la membrana apical.

La tinción de la membrana del endometrio se observa un patrón "arrosariado", apareciendo de forma intercalada zonas positivas granulares con zonas lineales.

En el feto se observa una tinción intensamente positiva de la membrana basal.

Nuestros hallazgos coinciden con los de Makin 1984 (163) (referimos al lector a la Tabla IV.4.5.1) en las tinciones positivas del epitelio de ovario, trompa y cérvix. Difiere nuestros hallazgos con los de Makin y Viale (247) (Tabla IV. 4. 6.3) en la expresión del CAM 5.2. en el endometrio adulto, estos dos autores encuentran positividad en el mismo en contra de la expresión negativa objetivada en nuestro trabajo.

Czernobilsky (59) también publica la expresión positiva del epitelio ovárico con esta keratina, datos que apoyan nuestros resultados.

Nuestros hallazgos en el cérvix coinciden con lo publicado por Raju (193), Bobrow (29), Makin (163) y Viale (247)

sobre la positividad en el endocervix y la negatividad en el ectocervix para el CAM 5.2.

Aunque los trabajos de estos autores sólo hacen referencia al cervix adulto.

En nuestro trabajo comprobamos que esta expresión en el cervix del CAM 5.2. existe ya desde el estado fetal.

Moll (172) refiere la ausencia de keratinas 8, 18 y 19 en el ectocervix (keratinas identificadas con el CAM 5.2.

Bobrow y Raju utilizan el CAM 5.2. para el estudio de la transformación neoplasica del cervix, concluyendo que el CAM 5.2 es un marcador útil indicativo de la transformación maligna, así como del potencial invasor en la neoplasia cervical.

Refiere Raju un 28% de casos positivos para el CAM 5.2. en el carcinoma invasivo, 2 casos positivos sobre 26 en el CIN III y no positividad para el CAM 5.2 en el CIN II y en el CIN I.

Hemos encontrado asimismo una positividad en la tinción con este anticuerpo en las células de la granulosa en contra de la negatividad de las células de la Teca, coincidiendo nuestros resultados con los trabajos de Benjamín (19) (sobre la expresión de los filamentos intermedios de la célula de la granulosa aspecto ya discutido en el apartado sobre la vimentina).

En los tumores ováricos en nuestro estudio hemos encontrado que todos los tumores ováricos epiteliales expresan el CAM 5.2. con gran intensidad, siendo el tumor de células claras el que lo expresa con menor intensidad (Grado I). En el carcinoma seroso papilar la tinción es muy intensa Grado III pero encontrando que esta tinción es focal, observándose que algunas papilas son negativas para el CAM 5.2.

La tinción en todos los tipos de tumores epiteliales es tanto de citoplasma como de membrana, aunque existe un reforzamiento de la membrana. Este evidente reforzamiento de la membrana en el tumor mucinoso con el CAM 5.2. no aparece con otros marcadores para keratinas como el EMA o el PKK1.

En el tumor de Brenner se observa un reforzamiento en la membrana que rodea la luz en los nodulos tumorales, pero no se

observa tinción de la sustancia intraluminal como aparece con el EMA.

En el adenocarcinoma endometriode la distribución de este antígeno en el citoplasma da lugar a un patrón "esmerilado" y no granular como encontramos en el EMA.

En resumen, en nuestro trabajo todos los tumores ováricos epiteliales expresan el CAM 5.2., siendo el tumor de células claras el que lo hace con menor intensidad.

El patrón de tinción celular mantiene la expresión paralela con los tejidos originales relacionados, salvo en el caso del adenocarcinoma de endometriode dado que en nuestro trabajo no encontramos expresión en el endometrio adulto, aunque sí se relaciona su patrón con la expresión en el endometrio fetal.

De acuerdo con Makin (163) los patrones con el CAM 5.2. no son selectivos para los diferentes tipos de epitelios, pero sí son homogéneos por lo que el CAM 5.2. se puede considerar como un buen marcador para el estudio del origen de un tumor o bien de una metástasis de tumor primario desconocido, dado que en general las metástasis conservan el patrón de keratinas de sus tumores primarios (194).

No hay diferencias en el patrón de inmunotinción en diferentes grados de diferenciación tumoral, dato también constatado por otros autores como Viale (247) y Dabbs (64).

Nuestros hallazgos coinciden con lo publicado por Viale (247) en la expresión uniforme de esta citokeratina en los tumores epiteliales ováricos aunque este autor refiere encontrar una expresión fundamentalmente citoplásmica con este anticuerpo. Nosotros hemos objetivado en este estudio que efectivamente existe una distribución citoplásmica pero hay también una intensa expresión en la membrana.

Sobre nuestro hallazgo de la expresión positiva del CAM 5.2. en los nidos de Walthard no hemos encontrado ninguna otra referencia bibliográfica.

Constatamos en nuestro trabajo que en la expresión de los antígenos marcados con el anticuerpo CAM 5.2. aparecen en el desarrollo evolutivo desde el periodo fetal manteniéndose patrones similares en los distintos tumores ováricos. Sólo encontramos una excepción en la expresión del CAM 5.2. en el desarrollo evolutivo del endometrio, comportándose según los datos objetivados el CAM 5.2 como un marcador oncofetal respecto al endometrio, ya que encontramos la expresión del mismo en el endometrio fetal y en el adenocarcinoma de endometrio pero no en el endometrio adulto. Este hallazgo nos sugiere el interés de una continuidad en la investigación del comportamiento de este anticuerpo en la transformación maligna del endometrio para comprobar si se pudiera utilizar como un marcador pronóstico en el endometrio, como parece que es útil en el cérvix.

* Comentamos a continuación los hallazgos con PKK 1:

Hemos encontrado expresión positiva para el PKK 1 en todos los epitelios del tracto genital femenino salvo en el endocérvix adulto.

En el feto se encuentran diferencias importantes en cuanto a la intensidad de la tinción entre tejidos en parafina y tejidos en congelación, a pesar de haber realizado tratamiento enzimático con tripsina. Encontramos una tinción débil en los tejidos en parafina respecto a una tinción muy intensa en tejidos en congelación.

Basándonos en los datos obtenidos se sugiere que deben ser utilizados tejidos en congelación para la investigación con este anticuerpo en tejidos fetales. Dado que el reconocimiento que los patrones tisulares en tejidos en parafina es incompleto y puede dar lugar a falsos negativos.

Respecto al endometrio encontramos que se repite aquí el comportamiento como marcador oncofetal de este anticuerpo al igual que encontramos con el CAM 5.2.

Con PKK 1 encontramos expresión positiva en el endometrio fetal, negativa en el endometrio adulto y positiva en adenocarcinoma de endometrio.

Respecto a los tumores epiteliales ováricos todos aparecen positivos para el PKK 1 al igual que encontramos para el EMA y para el CAM 5.2.

El PKK1 reacciona con un gran número de citokeratinas preferentemente con tejido glandular y epitelios simples. En la piel reacciona sólo con células glandulares y epiteliales del folículo piloso. De las referencias revisadas que utilizan el mismo preparado comercial, PKK1 de Laby Systems, encontramos un trabajo de Miettinen 1984 (167), en el que presenta una reactividad de este anticuerpo en diferentes carcinomas y adenocarcinomas, aunque en este trabajo no investiga Miettinen tumores del tracto genital femenino, ni tejidos normales del mismo (referencia a Tabla IV. 4. 1).

Viale 1988 (247) observa positividad con este anticuerpo en todos los tumores epiteliales ováricos, refiriendo una expresión de manera difusa en el citoplasma, datos que apoyan nuestro trabajo.

Respecto a la positividad encontrada en el adenocarcinoma de endometrio nuestros resultados están en concordancia con la positividad encontrada por Miettinen en el mismo.

Respecto al cérvix en nuestro trabajo encontramos positividad con el PKK 1 en el endocérnix fetal y en el ectocérnix adulto.

Moll publica en 1982 expresión en el ectocérnix de las keratinas 1, 4, 5, 6 y 12 y la ausencia en el mismo de keratinas 8, 18 y 19.

Nuestros hallazgos están en concordancia con lo publicado por Moll respecto a los resultados con el PKK1 y el CAM 5.2, encontrando positividad en el ectocervix adulto para el PKK 1 y negatividad para el CAM 5.2.

Encontramos una diferencia en la expresión del PKK1 en el endocervix entre el feto y el adulto ya que en el feto si que encontramos expresión del PKK 1 en el endocervix expresión que se pierde en el adulto.

Ya hemos hecho referencia a la utilización del CAM 5.2. como marcador para la transformación maligna y potencial invasor de la neoplasia cervical, referida por Raju (193) y Bobrow (29).

No hemos encontrado ningún trabajo sobre la utilización de la expresión de las citokeratinas expresadas por el PKK 1 en la transformación maligna cervical.

De los datos obtenidos y revisados en la literatura se sugiere como un trabajo interesante de investigación el estudio del comportamiento de este anticuerpo en la neoplasia cervical.

La distribución encontrada a nivel celular en este anticuerpo es tanto de citoplasma como de membrana, apareciendo un claro refuerzo en la tinción de esta última. Se observa un refuerzo en la tinción en las membranas basal y apical, lo que da al epitelio una imagen "en vías de tren".

Esta distribución de las keratinas debe ser el reflejo de su papel funcional dentro de la célula, habiéndose encontrado compartelización de los filamentos intermedios dentro de la célula, como ya corrobora Viale también respecto a la vimentina.

Encontramos una diferencia significativa en la expresión de las keratinas estudiadas en el epitelio ovárico adulto, encontrando que el PKK 1 marca dicho epitelio con menor intensidad que el resto de los anticuerpos marcadores de tejido epitelial estudiados (EMA, CAM 5.2 y AE1/AE3).

Respecto a los tumores es interesante constatar que al contratio que con el CAM 5.2. y con el EMA la tinción es focal en el adenocarcinoma de células claras en el seroso y en el endometrioides, encontrando en los dos primeros tumores una intensidad de solo Grado I, por lo que se puede concluir que el CAM 5.2. es en nuestra experiencia mejor marcador de la naturaleza epitelial de estos tumores, que el PKK 1. Por tanto, sería más útil utilizar el CAM 5.2. que el PKK 1 en el estudio de

un tumor de origen desconocido para determinar su naturaleza epitelial.

La sustancia que aparece en el lumen de los nidos del tumor de Brenner no se tiñe ni con el PKK 1 ni con el CAM 5.2., solo hemos encontrado tinción positiva de esta sustancia con el EMA.

Respecto al tumor mucinoso encontramos una diferencia en la expresión de las keratinas empleadas.

Encontramos en este tumor con el PKK 1 y con el CAM 5.2. una tinción intensamente positiva, Grado III y homogéneo, a diferencia del EMA que lo tiñe con menor intensidad y sólo de forma focal.

Encontramos aquí una correlación con el comportamiento del epitelio relacionado en su origen, el endocervical manteniendo el mismo patrón que este tejido en el feto.

Ya relaciona Scully 1977 (208) el que la expresión de los diferentes oncotipos de tumores epiteliales ováricos muestran un origen común en el epitelio celómico, el cual tienen un potencial para diferenciarse en epitelios que asemejan a diferentes epitelios Mülllerianos: epitelio de la trompa, del endometrio y del cérvix.

Nuestros datos proveen un soporte inmunohistoquímico a la similitud entre estos epitelios de origen a los que asemejan los diferentes tumores epiteliales ováricos, similitud no solo morfológica sino como se puede constatar apoyada por su patrón inmunohistoquímico de citokeratinas.

* Discusión de los hallazgos respecto al EMA.

Hemos encontrado una diferencia entre la expresión de este anticuerpo y los otros marcadores epiteliales estudiados (CAM 5.2, AE1/AE3 y PKK 1). Objetivamos que el EMA no se expresa en el epitelio de superficie fetal ovárico, apareciendo dicha expresión más tardiamente en la evolución dado que si se objetiva en el epitelio de superficie ovárico adulto.

Se ha objetivado en este trabajo una expresión positiva del EMA en el resto de los epitelios del tracto genital femenino, tanto en el feto, como en el adulto como en los tumores epiteliales ováricos y en el adenocarcinoma de endometrio.

Aunque en algunos epitelios aparece una tinción citoplásmica, este anticuerpo marca fundamentalmente la membrana y se demuestran como el anticuerpo dentro de los anticuerpos marcadores de epitelios estudiados que se expresa con más intensidad en la trompa fetal y adulta.

Al igual que con el PKK 1 y el CAM 5.2. se puede concluir que para obtener buenos resultados deben ser empleados tejidos en congelación en tejidos fetales, así como en la investigación del epitelio ovárico en el adulto.

Ya que la expresión es muy intensa tanto en la trompa como en el endometrio los resultados son buenos cuando se investiga este anticuerpo en la trompa y en el endometrio adulto en parafina.

Los quistes de inclusión no se marcan con este anticuerpo señalándose que por tanto hay una diferencia antigénica entre este epitelio y el epitelio de superficie ovárico, dato que resulta curioso ya que se asume que estos quistes de inclusión derivan del epitelio de superficie.

En el endometrio fetal el EMA marca todo el epitelio pero en el endometrio adulto normal solo aparece el mismo en la mitad basal. Se observa que el endometrio adyacente al endometrio neoplásico presenta un patrón de tinción diferente que el resto del endometrio normal ya que aunque se conserva su estructura

morfológica se observa que el EMA marca todo el epitelio. Sería un indicio de desdiferenciación o de indiferenciación.

En el adenocarcinoma de endometrio observamos una expresión muy intensa del EMA fundamentalmente de membrana con un refuerzo en la membrana luminal.

Estos hallazgos sugieren que este anticuerpo también sería interesante estudiarlo en hiperplasias adenomatosas atípicas que potencialmente pueden transformarse en adenocarcinomas para investigar si serviría como un marcador de transformación maligna.

En el ectocérvix del adulto aparece teñido con el EMA los 2/3 superiores del epitelio, no apareciendo ninguna tinción en la zona basal.

Por tanto resumimos que en ectocérvix adulto el EMA marca los 2/3 superiores del epitelio, el PKK 1 todo el epitelio y no aparece inmunotinción con el CAM 5.2.

Los nidos de Walthard se tiñen de forma positiva con el EMA al igual que con el CAM 5.2.

El interés de los hallazgos de este trabajo con el EMA se basa en que siendo el EMA un buen marcador epitelial y habiéndose realizado trabajos para su utilización como marcador tumoral en tumores ováricos, no hemos encontrado ningún trabajo detallado en tejido fetal y adulto normal y son escasos los trabajos realizados en tumores ováricos, observación también realizada por Hitchcock 1989 (124).

Otro anticuerpo estrechamente relacionado con el EMA, el HMFG-1 (que reacciona con un material de rango molecular similar, 265-40KDA) se ha empleado en la mama obteniendo resultados conflictivos, dado que autores como Berry 1985 no encuentra asociación entre el patrón de inmunotinción con este anticuerpo y el pronóstico en el cancer de mama. Pero en cambio, Wilkinson 1984 presenta que la negatividad con este anticuerpo hace preveer un pobre pronóstico (referencia tomada de 32).

La estrecha relación de este anticuerpo con el EMA hacía interesante comprobar su comportamiento en el tracto

genital femenino y en la transformación neoplásico de estos tejidos.

El EMA de Dako es un anticuerpo monoclonal obtenido contra preparaciones de membrana de leche humana. El determinante reconocido por este anticuerpo es un carbohidrato (32). Aunque su determinante antigénico no está bien reconocido (184), Turnbull (238) expresa que el EMA reconoce un amplio espectro de epítomos de alto peso molecular, 265-400KD.

Este anticuerpo se ha encontrado en una amplia variedad de epitelios normales y neoplásicos (48) (120).

Parece probada la utilidad de este anticuerpo en el diagnóstico histopatológico (184).

La amplia distribución en los epitelios sugiere que el EMA tiene un importante papel, aunque hasta ahora no ha sido definido. Sloane 1982 (218) postula la hipótesis de que tendría un papel protector, aumentando su producción ante una variedad de enfermedades, incluyendo las neoplasias.

Se ha encontrado que células no epiteliales, como los linfocitos (70) expresan el EMA. En nuestro estudio en el aparato genital interno, encontramos que la expresión del mismo se reduce a los epitelios.

En la revisión bibliográfica sólo hemos encontrado una descripción amplia del comportamiento de un anticuerpo similar al EMA (48) (124), el NCRC11, estudiado en adultos. Nuestros hallazgos coinciden con los datos obtenidos con este anticuerpo similar al EMA descrito por Hitchcock 1988 (124). Encontrando a diferencia de este autor que el EMA aparece como positivo en los 2/3 superiores del epitelio y con el NCRC 11 el ectocérvix es negativo. Nuestros hallazgos también coinciden con la positividad descrita en el endometrio y en cérvix por Cordel (48) con el EMA. No especifica Cordel si la positividad encontrada aparece en el endo o en el ectocérvix.

También coinciden en nuestros resultados del endometrio adulto positivo para el EMA con los de Pinkus (190).

Respecto a los patrones de tinción coincide lo encontrado en este estudio con lo que publican Bradgate (32), Cordell (48), Santini (203) y Aguirre (3).

Los patrones de tinción, fundamentalmente de membrana aunque nosotros encontramos al igual que Bradgate en algunos tejidos una tinción citoplásmica difusa en la trompa fetal en congelación y en el adenocarcinoma endometriode ovárico, siendo el resto de los epitelios la tinción exclusivamente de membrana. Como también refiere Bradgate apareciendo más intenso las membranas apicales

Estos hallazgos difieren de lo publicado por Ormerod en 1981 (referencia de (184)) sobre el marcaje del EMA sólo en las membranas apicales.

Los hallazgos positivos para el EMA en el adenocarcinoma de endometrio, apoyan estos mismos resultados descritos por Delsol 1984 (70) y Cordell (48).

Creemos que el hallazgo del cambio de patrón de tinción en el endometrio, normal morfológicamente, adyacente a las áreas de carcinoma de endometrio puede ser interesante como fuente de estudio en las hiperplasias atípicas, dado que encontramos en las áreas cerca del adenocarcinoma de endometrio un patrón de tinción similar al del endometrio tumoral, es decir, encontrando una tinción de todo el epitelio en contra de la tinción de la zona basal, con un reforzamiento de la membrana luminal en el endometrio normal.

Estos hechos hacen pensar que aparece un cambio antigénico previo al cambio morfológico. Siendo este cambio antigénico detectable utilizando el EMA.

Hay varios trabajos publicados respecto a la utilización del CAM 5.2. como marcador de la transformación neoplásica invasiva en el cérvix (se refiere al lector al apartado de discusión del CAM 5.2.).

Dado que Cordell publica una positividad del EMA en el carcinoma escamoso de cérvix nos parece un campo abierto a la

investigación el estudio del EMA en la transformación neoplásica cervical.

En cuanto a los tumores epiteliales ováricos hemos encontrado una diferencia en el comportamiento del EMA entre tumores mucinosos y no mucinosos.

Se ha objetivado una tinción de la membrana con reforzamiento de la membrana apical en los tumores seroso, endometrioides, de células claras y en el tumor de Brenner, en cambio en el tumor mucinoso la tinción es débil y muy focal.

Nuestros hallazgos apoyan este hecho reflejado por otros autores como Bradgate (32), Hitchcock (124), Delsol (70) y Pinkus (190).

Pinkus encuentra negatividad en la membrana en los tumores mucinosos y positividad en el citoplasma, en nuestro trabajo la tinción de membrana es débil y muy focal pero no encontramos tinción en el citoplasma.

Otras diferencias respecto a estos autores es el hecho de que Bradgate encuentra el tumor de células claras negativo para el EMA, apareciendo este tumor en nuestro estudio positivo para el EMA, lo que puede representar que los antígenos determinados con este anticuerpo no aparezcan de forma homogénea en todos los tumores de células claras, ya que el tipo de tejido utilizado, en parafina así como la técnica y el tratamiento enzimático con tripsina ha sido igual en ambos trabajos.

Respecto al tumor mucinoso encontramos también que Hitchcock encuentra una tinción positiva focal en la membrana de este tumor, con el CNCRCl1, al igual que en este estudio con el EMA.

Esta diferencia en el comportamiento antigénico entre los tumores mucinosos y los no mucinosos viene a añadir un dato más a las diferencias entre este tumor y el resto de los tumores epiteliales encontrados con otros marcadores tumorales como el Ca 125.

Nuestros hallazgos coinciden con los de otros autores (124) (203) (3), no encontrando diferencia en la expresión del EMA en relación al grado de diferenciación del tumor.

Consideramos que la obtención de datos que confirmen la expresión de este anticuerpo en tumores epiteliales es importante, ya que se ha utilizado el EMA en el estudio del líquido ascítico para el diagnóstico del origen del tumor primario (77) (103) (115), concluyendo que la utilización de este anticuerpo aumenta los diagnósticos de un 76 a un 100%, según Guzman (115).

Parece importante señalar la diferencia en el comportamiento del tumor mucinoso respecto a este anticuerpo, ya que aparece positivo solo focalmente y de forma débil en nuestro estudio y según otros autores negativo en este tumor su utilización como marcador epitelial en células de líquido ascítico tumoral podría llevar a descartar de una manera errónea el origen epitelial del tumor primario, en el caso de que se tratara de un tumor mucinoso.

Estos datos apoyan lo referido ya por Crowther (58) respecto a la utilidad de que es necesario utilizar una batería de varios marcadores para aumentar la eficacia en el diagnóstico.

Recalcamos aquí lo referido en el capítulo IV. 4 sobre la problemática de la utilización del EMA en el diagnóstico diferencial de tumores anaplásicos (97), respecto a un posible error en el diagnóstico diferencial entre carcinoma y el tumor anaplásico de células plasmáticas. En este último tumor se puede perder la expresión de Leu.M1 y aparecer expresión para el EMA (70), y en algunos casos se ha descrito que el carcinoma ovárico puede expresar el Leu. M1 (215), por tanto estos datos deben ser tenidos en cuenta al hacer el diagnóstico diferencial entre carcinoma y tumor anaplásico de células plasmáticas.

Respecto al tumor de Brenner coinciden nuestras observaciones con las de Santini respecto a la positividad del EMA en la sustancia que ocupa los espacios glandulares en los

nidos del tumor, así como en la tinción de membrana del mismo en las células epiteliales.

Santini (203) se apoya en los hallazgos similares, entre el uroepitelio y las células epiteliales del tumor de Brenner, obtenidos con un panel de anticuerpos (ver tabla IV. 4. 8. 2.), para apoyar la teoría de la histogénesis de este tumor en el epitelio celómico por un proceso de metaplasia urotelial (194) (217) o bien en su origen en los nidos de Walthard.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo apoyan la similitud, al menos en el comportamiento antigénico del tumor de Brenner con el resto de los tumores ováricos epiteliales no mucinosos, queriendo señalar aquí el hecho de la tinción positiva paralela obtenida por nosotros en los nidos de Walthard.

Estos datos presentados por Santini, y apoyados por nuestros resultados estarían en oposición a las teorías sobre el origen del tumor de Brenner en las células del estroma ovárico (109), en el mesonefros (20), en las células de la granulosa (217) o en las células germinales (2).

Señalamos que hemos encontrado negatividad en la expresión de las células de la granulosa para el EMA, dato que puede apoyar el que el origen del tumor de Brenner no esté en estas células. También apoyaría esta teoría los datos aportados por Aguirre (3) sobre la negatividad del EMA en los tumores de las células de la granulosa.

Aguirre en un interesante trabajo de 1989 (3) intenta aclarar la histogénesis del tumor de células claras, estudiando un panel de anticuerpos (vimentina, EMA, CAM 5.2. y S100). No puede relacionar, al menos desde el punto de vista antigénico este tumor con los tumores de la célula de la granulosa. Encuentra una expresión antigénica en el tumor de células claras más similar a los tumores epiteliales, concluyendo este autor que habría que considerar al tumor de células claras como un tipo especial de tumor epitelial.

Nuestros datos obtenidos en el tumor de células claras con el panel de anticuerpos estudiado (CAN 5.2. (+), EMA (+), PKK

1 (+), S 100 (-) y AFP (-)), también apoyan la similitud de este tumor con el resto de tumores ováricos epiteliales.

Este panel de expresión antigénica puede ser útil al considerar el diagnóstico diferencial a veces difícil (106) entre estos tumores y los tumores del seno endodérmico.

En resumen los datos encontrados con el EMA:

- Apoyan lo publicado por otros autores en tumores epiteliales ováricos, sirviendo el EMA como marcador diferenciador entre tumores mucinosos y no mucinosos.
- Apoyan el origen epitelial del tumor de Brenner y el tumor de células claras.
- Encontramos que este anticuerpo marca fundamentalmente antígenos de membrana apareciendo un refuerzo en la membrana apical, dato concordante con todos los autores revisados, salvo con lo publicado por Ormerod que encuentra sólo este anticuerpo en la membrana apical.
- Encontramos positividad en los 2/3 superiores del ectocérvix a diferencia con otros autores que encuentran el mismo negativo para el EMA.
- Apuntan nuestros resultados con los datos obtenidos en el EMA que este podría ser un marcador de transformación maligna del endometrio, por los cambios en el patrón de expresión celular.
- Presentamos los datos de expresión evolutiva de este anticuerpo desde el feto al adulto y a la expresión neoplásica en el tracto genital femenino.

Evidenciamos que la expresión del EMA en la superficie ovárica no aparece en el feto al menos hasta la 22 semana (edad fetal máxima estudiada), observándose positiva en el epitelio de superficie ovárico adulto.

Encontramos una correlación desde el punto de vista antigénico entre el cérvix fetal y el tumor mucinoso, expresando ambos tejidos de forma débil este anticuerpo, en contra de la expresión intensa en el ectocérvix adulto.

Pasamos a comentar los resultados con otros antígenos tisulares estudiados.

*** Antígeno H del Grupo sanguíneo.**

Los datos de la revisión bibliográfica sobre este antígeno en el urotelio fetal (234), endometrio fetal (dependiente del grupo sanguíneo del feto) (129), ovario (69), adenocarcinoma ovárico (69), cérvix (67), carcinoma de cérvix (67), tumor del saco Vitelino (177), carcinoma embrionario (177), y el hecho de que diferentes autores como Teglbjoerg (234), Davidsohn (67) y Cordon Cardo (61) apuntan que este antígeno está presente en tejidos normales y que pierde su expresión carcinomatosa en tejidos como el cérvix y el urotelio y que en cambio en el tejido colonorectal (71) (205) (257) y en el endometrio, según Inque (129), se comporta como un antígeno oncofetal, nos sugirió interesante incluir este anticuerpo en el panel utilizado en este estudio.

Inque 1987 (129) y Gupta (113) encuentran positividad de este antígeno en el endometrio fetal, negatividad en el endometrio adulto y positividad en el adenocarcinoma de endometrio.

En nuestro trabajo hemos encontrado coincidiendo con estos autores una expresión positiva del mismo en el adenocarcinoma de endometrio y una expresión negativa en el endometrio adulto, pero no hemos podido constatar positividad en el endometrio fetal en ninguno de los casos estudiados. La negatividad en el endometrio fetal aparece tanto en tejidos en congelación como en tejidos en parafina.

Pueden obedecer esta diferencia en los resultados en el tejido fetal a diferencia en las técnicas empleadas. Ya que Inke utiliza la técnica de la avidina-biotina y utiliza el anticuerpo monoclonal de laboratorios Dako y en nuestro trabajo utilizamos el PAP y el anticuerpo monoclonal del laboratorio Lipshaw. En ambos casos se utilizan fijados en formol e incluidos

en parafina. Gupta utiliza la técnica del MCAR (Mixed cell agglutination reaction), también utilizando tejidos en parafina.

Respecto al cérvix Davidsohn (67) publica positividad en el cérvix adulto con pérdida del mismo en la transformación maligna, también empleando la técnica MCAR, y utilizando antisueros no comerciales.

En nuestro trabajo no se demuestra positividad con este antígeno ni en el cérvix fetal ni en el adulto.

Tampoco encontramos positividad en ninguno de los tumores epiteliales estudiados.

Los resultados negativos en el endometrio fetal y en el cérvix nos llevan a la conclusión de que posiblemente no sea la técnica del PAP y es posible que tampoco el anticuerpo empleado es más idóneo para la investigación de este antígeno. Podríamos explicar que la positividad sin embargo encontrada en el adenocarcinoma de endometrio podría obedecer a que en este tumor la expresión de este antígeno sea muy intensa, y por tanto detectable o bien a que en ese tejido se hubiera realizado una más correcta fijación del mismo.

*** Alpha 1 antitripsina**

En nuestro trabajo solo hemos encontrado una tinción positiva en algunas células estromales aisladas en el tejido ovárico fetal, para este anticuerpo.

No se ha encontrado ninguna tinción positiva en otro tejido del estudio, comprobándose la utilidad de la técnica en tejidos control.

Ulbright 1987 (239) ha descrito positividad en el tumor de células claras para el Alpha 1 antitripsina, dato que no encontramos en nuestro estudio.

Ninguno de los tumores epiteliales presenta tinción positiva para este anticuerpo.

En el trabajo de revisión sólo hemos encontrado referencias positivas en tumores, ováricos además del ya referido

anteriormente, en tumor de células germinales, en el tumor del saco Vitelino, en el carcinoma embrionario y en el disgerminoma (182).

De nuestro trabajo concluimos que ninguno de los tumores epiteliales ováricos expresa este antígeno.

* El anticuerpo contra el Factor VIII se ha utilizado como un anticuerpo de control encontrando positividad en las células endoteliales y negatividad en el resto de los tejidos estudiados.

* El Ki 67 también se ha utilizado como anticuerpo control, encontrando positividad nuclear en algunas células del tejido fetal en congelación.

* AFP (Alfa-Feto-Proteína)

El anticuerpo para el AFP ha sido utilizado fundamentalmente para el diagnóstico diferencial de tumores del seno endodérmico ((+) en el 100%) y del carcinoma embrionario ((+) en el 70%) (182) (151) (149) (150) (152).

También se ha utilizado para el diagnóstico diferencial entre los tumores del seno endodérmico y los Tumores de Células Claras, ya que en algunos casos este diagnóstico puede ser dificultoso.

Los estudios inmunohistoquímicos apoyan la observación ya realizada por Telium 1965 (235), en base a datos morfológicos.

El estudio de la expresión antigénica del Tumor de Células Claras ha servido para apoyar la teoría, más aceptada del origen epitelial (209) del Tumor de Células Claras. Este tumor fué originariamente clasificado por Schiller (referencia tomada de 260) como mesonefrooma.

Diferentes estudios del perfil antigénico del Tumor de Células Claras han venido a apoyar la naturaleza Mulleriana, ya apuntada por Scully y Barlow (209) de este tumor.

Aunque el Tumor del seno endodérmico y el Tumor de Células Claras pueden ser habitualmente diferenciadas por parámetros histológicos y químicos existen algunos casos equívocos.

La diferenciación de estos dos tumores puede basarse en la presencia de AFP en el suero de pacientes con tumor del seno endodérmico. Pero la demostración del AFP en el suero de pacientes con diferentes tumores ováricos (123) (42) y la ausencia de AFP en algunos tumores del seno endodérmico indican la necesidad de marcadores adicionales.

Zirker (260) utiliza el Leu-M1, junto con la AFP para el diagnóstico diferencial entre estos tumores. El Leu-M1, que primariamente es un antígeno mielomonocítico parece ser un marcador útil en el diagnóstico diferencial entre carcinoma y otros tumores.

Kasper (42) publica la localización con técnicas inmunohistoquímicas en células tumorales en el 7% de los carcinomas epiteliales ováricos del AFP y Guchi encuentra también AFP positiva en el Cistoadenocarcinoma seroso papilar, refiriendo este último autor negatividad del AFP en el ovario adulto normal.

El mecanismo de producción del AFP para tumores ováricos que no tienen su origen en células germinales no está claro.

Zirker encuentra que una inmunotinción positiva para el AFP y negativa para el Leu-M1 apoya el diagnóstico de tumor del seno endodérmico y que una inmunotinción positiva para el Leu-M1 y negativa para la AFP apoya el diagnóstico de tumor de células claras. Concluye de este trabajo que si ambos marcadores son positivos o negativos no tienen valor diagnóstico.

En nuestro trabajo no hemos encontrado expresión del AFP en ninguno de los tejidos estudiados.

En contra de la referencia de Casper (42) que encuentra AFP positiva en 2 de 52 tumores serosos, 3 de 39 tumores mucinosos y 2 de 25 endometrioides, no encontramos ninguna positividad de nuestro estudio en dichos tumores epiteliales.

Casper refiere que sólo en 2 casos encuentra la AFP en más del 50% de células tumorales y refiere que la tinción obtenida es exclusivamente citoplásmica. Casper utiliza en su trabajo tejidos en parafina y la técnica del PAP.

En este trabajo no encuentra al igual que nosotros la expresión del AFP en ovarios normales.

Nuestros datos añaden a lo publicado el que esta negatividad en el ovario adulto no es una pérdida de expresión del antígeno en evolución dado que constatamos su negatividad ya a nivel fetal en todo el tracto genital femenino.

Coinciden nuestros hallazgos negativos con lo publicado por Zirker (260) y Casper (42) sobre la negatividad del AFP en el tumor de células claras y sobre la negatividad del AFP en el tumor de Brenner (203).

En resumen, de nuestro trabajo de revisión y apoyado por nuestros resultados se concluyen que el AFP es útil empleada conjuntamente con el Leu-M1 para el diagnóstico diferencial entre el tumor del seno endodérmico y el Tumor de Células Claras.

Dado que el papel biológico del AFP es escasamente conocido podemos concluir, al menos de nuestro trabajo, que no parece tener función en el desarrollo fetal, al menos entre la 15 y 22 semanas, en el tracto genital femenino.

* S-100

El S-100 se ha descrito en células de origen neuroendocrino, células de Schwan, en melanocitos, en células de Langerhans y en algunos tumores epiteliales (231).

Ya que se ha encontrado en algunos tumores epiteliales como el tumor de mama (73), (204), en el tumor nasofaríngeo, carcinoma pulmonar y carcinoma gástrico (176), y además la referencia de Mori de que el hallazgo de células positivas para el S-100 dentro de este tumor sería un factor de buen pronóstico nos hizo interesante incluir en el estudio este anticuerpo.

Respecto a los tumores ováricos sólo hemos encontrado diferencia de positividad para el S-100 en 1/3 de los tumores de la granulosa (3), y en el 17% de los Teratomas, cuando existían áreas de diferenciación glial o de nervio periférico.

Niehans 1988 (182) encuentra negatividad en el resto de los tumores ováricos.

Dado que este anticuerpo marca células de origen endocrino y neural resulta interesante su expresión en el tumor de células claras dado que algunos autores han querido relacionar este tumor con un tumor neuroendocrino, y que autores como Aguirre encuentran células positivas para el NSE y cromogranin A (marcadores de células neuroendocrinas) en este tumor y que también se han referido a hallazgos morfológicos que pueden sugerir que se tratara de un tumor neuroendocrino, según Fortuni (referencia de (3)).

En nuestro trabajo no hemos encontrado expresión en las células epiteliales del tracto genital femenino ni en el feto ni en el adulto. Esta expresión se mantiene negativa tanto si se utilizan tejidos en congelación como en parafina.

Tampoco hemos encontrado expresión positiva para el S-100 ni en el adenocarcinoma de endometrio ni en los nidos de Walthard.

En cambio, hemos encontrado en el tumor de células claras unos tractos dentro del área tumoral positivos para el S-100. Estos tractos positivos para el S-100 aparecen dentro del estroma tumoral, lo que sugiere que es posible la participación de un componente nervioso o neuroendocrino en este tumor.

Aunque como ya hemos comentado los resultados en conjunto encontrados con el panel de anticuerpos empleados en este estudio apuntan a un comportamiento antigénico de este tumor como tumor epitelial.

De la revisión realizada no encontramos ninguna referencia a positividad del S-100 en tumores epiteliales ováricos, pero sí en 1/3 de tumores de la granulosa.

En nuestro estudio hemos observado otro hecho sobre el que no encontramos ninguna referencia en la literatura.

Hemos observado elementos unicelulares con diferenciación fibrilar en la zona subepitelial en el adenocarcinoma del endometrioide, que se interpretan como elementos neuroendocrinos o nerviosos. Aparece también una tinción positiva en células aisladas entre las estructuras glandulares, que por los patrones de tinción se excluye que sea debido a artefacto o a difusión.

Apuntamos que podría ser interesante corroborar estos hallazgos en un número superior de casos.

En el tumor de Brønner, en el papilar seroso y en el mucinoso no encontramos ninguna estructura positiva para este anticuerpo.

Pasaremos a comentar por último los hallazgos obtenidos con los anticuerpos monoclonales:

*** URO-1, URO-5, URO-8 y URO-10**

Estos anticuerpos obtenidos en cultivo de células de tejido renal y vesical humano, fueron descritos en principio como anticuerpos específicos contra estos tejidos, pero se han encontrado tinciones positivas del URO-1 en el esófago, en la piel y de forma heterogénea en la matriz intersticial de fetos y adultos.

También se ha descrito positividad del URO-5 en la mama adulta, en el cérvix adulta y fetal, en el esófago y en la piel.

Otros UROS no utilizados en este trabajo, como el URO-3 aparece positivo en la mama y el URO-4 en el leiomeiosarcoma (236).

Tomaszewski (236) sugiere la utilización de los UROS 2,3 y 4 para excluir el origen renal de un tumor de origen desconocido.

Dado que hay datos de positividades de estos anticuerpos UROS en tumores diferentes al renal o al vesical su positividad en metástasis de tumor primario desconocido no deben implicar necesariamente su origen renal.

Dadas las escasas referencias del comportamiento de estos anticuerpos fuera del tejido renal y vesical creemos interesante nuestro estudio con dichos anticuerpos en el tracto genital femenino.

Ya que estos anticuerpos se pueden emplear en tejidos en congelación y que los tumores epiteliales ováricos utilizados en nuestro trabajo se encontraban embebidos en parafina, no hemos estudiado los mismos en ninguno de los tumores epiteliales.

El estudio de este anticuerpo se ha realizado en el tracto femenino fetal en congelación, en el riñón y ureter fetal así como en el ovario adulto normal.

Del estudio del riñón fetal:

Hemos encontrado alguna diferencia en la expresión de este anticuerpo, respecto a lo descrito por Cerdón Cardo en el riñón adulto (ver Tabla VI. 13.1).

Respecto al URO-1 se encuentra en el feto una tinción positiva de los colectores finales, tinción que no se describe en el adulto.

El resto de la expresión positiva en el riñón coincide con la del adulto, apareciendo teñidos los glomérulos, y el epitelio de transición de la pelvis y los cálices.

En el feto también encontramos tinción positiva de estructuras tubulares en fases de formación de nefrona.

Respecto al URO-5 también se observan diferencias de expresión del anticuerpo respecto al riñón adulto.

Encontramos teñidos los túbulos proximales en el feto, en contra de la descripción negativa de los mismos en el riñón adulto.

Las demás estructuras marcadas coinciden con lo descrito en el riñón adulto (Asa de Henle, túbulos distales, túbulos colectores y urotelio).

En el URO-8 también se encuentran diferencias entre el feto y el adulto.

En el adulto sólo se describe positividad para el Asa de Henle, encontrando en nuestro estudio positividad en el feto en el urotelio. Aunque comentamos que esta positividad del urotelio fetal es débil y focal.

En cambio no encontramos diferencia de expresión entre el feto y el adulto respecto al URO-10 observándose al igual que en el adulto tinción de los túbulos proximales.

En resumen se evidencia que en el feto se expresan antígenos reconocidos y por 3 de estos anticuerpos estudiados (URO-1, URO-5 y URO-8), en algunas estructuras, y que esta expresión se pierde en el desarrollo adulto.

Las expresiones perdidas en el riñón adulto son: la tinción de los colectores finales por el URO-1, la tinción de los túbulos proximales por el URO-5 y la tinción del urotelio por el URO-8.

Este es otro ejemplo de la diferencia antigénica observada en la evolución de tejidos en su desarrollo normal, aunque no conocemos, por el momento, la repercusión funcional de estos cambios en la estructura antigénica.

Nuestros datos difieren de lo publicado respecto al URO-1 y al URO-5, no encontrando diferencias, Cordon Cardo (52), en la expresión de este anticuerpo en el riñón adulto y el fetal.

Aunque hay que reseñar que estos datos no tienen porque ser necesariamente contradictorios dado que el estudio de Cordon Cardo se realiza en fetos entre la 12 y 14 semanas de gestación siendo superior la edad gestacional de los fetos estudiados en nuestro caso.

También hay diferencias técnicas entre estos dos trabajos, ya que Cordon Cardo utiliza la inmunofluorescencia y en nuestro estudio se utiliza el PAP.

Respecto a la expresión de estos anticuerpos en el tracto genital femenino hemos encontrado:

En el ovario una tinción positiva con el URO-1, URO-5 y URO-10 y negativa con el URO-8 en el epitelio ovárico fetal así como en el adulto.

Pero observamos cambios en la intensidad de la tinción entre los diferentes anticuerpos, según se estudie el feto o el adulto, según expresamos en la Tabla VII. 2.

TABLA VII. 2

DIFERENCIA EN LA EXPRESION DE LOS URO-1, URO-5 y URO-10
EN EL EPITELIO DE SUPERFICIE OVARICO

	URO-1	URO-5	URO-10
Feto	II	III	I
Adulto	III	II	III

Nota: I, II y III corresponden a las distintas intensidades de Grados de tinción de menor a mayor intensidad.

Se observa una mayor intensidad en la expresión en el adulto de los UROS-1 y 10 y menor intensidad en el adulto en el URO-5.

En los dos epitelios de superficie tanto fetal como ovárico se mantienen los patrones celulares de tinción. Apareciendo tinción en la membrana con reforzamiento del borde apical y tinción citoplásmica.

En el adulto la expresión con el URO-1 y el URO-5 es focal.

En resumen, en el epitelio adulto ovárico el URO-1 y el URO-10 aumentan en intensidad respecto al epitelio fetal, pero

aparecen en este sólo de forma focal y no homogénea como en epitelio de superficie en el feto.

Nuestros hallazgos difieren con lo publicado por Córdón Cardo (52) que encuentra negatividad en el epitelio tanto adulto como fetal (en fetos entre 12 y 14 semanas) con el URO-1 y el URO-5.

Reseñamos que en los casos del URO-1, URO-5 y URO-10 en el adulto se observa que los quistes de inclusión en el adulto presentan una tinción más homogénea y más intensa que el resto del epitelio ovárico.

Esta diferencia entre los dos epitelios, de superficie ovárico y quistes de inclusión recuerda que esto puede reflejar el mantenimiento en estos quistes del patrón antigénico fetal.

Respecto al cérvix encontramos el endocervix positivo para el URO-1, URO-5 y URO-10, el URO-8 es negativo tanto en el exocervix como en el endocervix.

No se observa inmunotinción en ningún caso para el ectocervix.

Nuestros hallazgos coinciden con la positividad encontrada en el cérvix por el URO-5 por Córdón Cardo, aunque este autor en su trabajo no especifica si dicha positividad aparece en el endo o en el ectocervix o en ambos casos.

En el endometrio fetal encontramos una tinción positiva para el URO-1 en la mitad basal del endometrio, apareciendo sólo tinción de la membrana, con el URO-5 y el URO-10 encontramos una tinción positiva, aunque débil y focal.

Estas observaciones difieren de la negatividad descrita en el endometrio para el URO-5 y el URO-10. Aunque volvemos a recordar aquí la diferencia en la edad gestacional en los fetos estudiados, siendo los fetos en el trabajo de Córdón Cardo de menor edad gestacional.

En la trompa fetal no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica respecto a estos anticuerpos.

Hemos encontrado positividad para el URO-1 y para el URO-5.

Con el URO-5 hemos encontrado una diferencia de expresión entre la trompa distal y la proximal, apareciendo más intensa la porción proximal. El patrón de tinción en la trompa es también un patrón de tinción de membrana.

Es de reseñar que de todo el panel de anticuerpos utilizado en nuestro estudio sólo con el URO-5 se ha encontrado diferencia en la expresión entre diferentes partes de la trompa.

Encontramos con el URO-10 una tinción débilmente positiva y focal, con el URO-8 una tinción negativa. Por tanto, los anticuerpos que marcan de forma homogénea e intensa la trompa fetal son el URO-1 y el URO-5.

Creemos importante reseñar que la diferencia de expresión encontrada entre el trabajo de Cordón Cardo y el nuestro puede ser debida a la diferencia de edad gestacional entre los fetos empleados.

Creemos que los hallazgos obtenidos con estos anticuerpos son interesantes dada la poca experiencia con los mismos en el tracto genital femenino y dado que estos anticuerpos tienen un amplio campo potencial de aplicación en el estudio de la embriogénesis.

CAPITULO VIII.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Encontramos expresión de la Vimentina en el epitelio de superficie fetal en tejidos en congelación y en parafina, aunque con menor intensidad en estos últimos. En el epitelio ovárico adulto sólo se objetiva la Vimentina en tejidos en congelación, de lo que se podría concluir que posiblemente la expresión de la Vimentina sea más intensa en el feto que en el adulto.

2.- El perfil antigénico encontrado en las células de la granulosa, Vimentina positivo y CAM 5.2 positivo, es igual al encontrado en el epitelio ovárico lo que podría apoyar el discutido origen de las células de la granulosa en el epitelio ovárico.

3.- No se ha objetivado expresión de la Vimentina en ningún tumor epitelial ovárico.

4.- No encontramos expresión de la Desmina en ninguno de los epitelios del tracto genital femenino.

Las capas musculares del tejido vascular en el feto no expresan la desmina, encontrando esta expresión positiva en el adulto. De ello se podría concluir que o bien su expresión es más débil en el feto o bien que esta expresión aparece muy tardíamente en el desarrollo. En cambio en las capas musculares de la trompa los patrones que encontramos son idénticos en el feto y en el adulto.

5.- Encontramos expresión de la Desmina en el estroma fetal ovárico y en el Tumor de Brenner siendo negativa la expresión en el estroma ovárico adulto y en los otros tumores epiteliales. De los datos obtenidos parecer existir una diferencia antigénica del estroma entre el Tumor de Brenner y el resto de los tumores epiteliales ováricos.

6.- De nuestro trabajo se puede concluir que la Desmina se puede investigar tanto en feto como en adulto, en tejidos en congelación como en parafina, empleando tratamiento enzimático.

7.- No hemos encontrado expresión de los antígenos reconocidos por el AE1/AE3 en el tracto genital de fetos; en el adulto sólo hemos encontrado expresión en el epitelio de superficie ovárico. Dentro de los tumores investigados encontramos expresión positiva con este anticuerpo en las células epiteliales del Tumor de Brenner y en el Tumor de Células Claras, así como en las zonas de metaplasia escamosa del adenocarcinoma de endometrio.

8.- Hemos encontrado una expresión positiva del CAM5.2. y el PKK1 en los epitelios tubárico, ovárico y endocervical, expresión que aparece en el feto y se mantiene en el adulto y en los tumores epiteliales ováricos, conservando estos patrones similares a los epitelios con los que se relacionan en su diferenciación.

No hay positividad para el PKK1 en el epitelio endocervical adulto.

En el ectocérvix adulto encontramos distintas expresiones con los anticuerpos CAM 5.2, PKK1 y EMA.

El EMA marca los 2/3 superiores del epitelio, el PKK1 marca todo el epitelio y el CAM 5. 2 no se expresa en el ectocérvix.

9.- El CAM 5.2. y el PKK1 se expresan, tanto en el citoplasma como en la membrana, con un reforzamiento de esta última en ambos. El reforzamiento de membrana es más uniforme con el CAM5.2. que con el PKK1. El CAM 5.2. se expresa con mayor intensidad en la membrana apical, en tanto que con el PKK1 el reforzamiento aparece en la membrana basal y en la apical. Los patrones de ambos anticuerpos se mantienen desde el feto, al adulto y en los tumores epiteliales ováricos y en el Adenocarcinoma de endometrio.

10.- Hemos encontrado que el EMA y el AE1/AE3 a diferencia del CAM 5.2 y del PKK1 no se expresan en el epitelio de superficie ovárico fetal, encontrando en el epitelio ovárico adulto expresión de estos cuatro anticuerpos. En los quistes de inclusión en el ovario adulto se observa para el EMA el mantenimiento del patrón fetal.

11.- En todos los tumores epiteliales ováricos se encuentra expresión del PKK1, esta expresión es débil y focal en el Tumor de Células Claras, en el Seroso y en el Endometriode, a diferencia de la expresión intensa y homogénea que encontramos con el EMA y con el CAM 5.2.

Con EMA, el CAM 5.2 y el AE1/AE3 no hemos encontrado diferencias en los patrones de expresión según el grado de diferenciación de los tumores epiteliales ováricos, solamente con el PKK1 se encuentran diferencias de patrón según el grado de diferenciación tumoral, apareciendo la inmunotinción más focal en las áreas más indiferenciadas del tumor.

Del trabajo se puede concluir que el CAM 5.2. sería el mejor marcador para investigar el origen epitelial de un tumor ovárico.

12.- De los resultados obtenidos con el EMA en nuestro trabajo se podría concluir que el patrón de expresión de este anticuerpo es diferente en los tumores mucinosos y los no mucinosos, ya que marca de forma muy intensa, uniforme y homogénea las células epiteliales de los tumores no mucinosos, apareciendo una tinción muy débil, focal y sin tinción de la membrana epitelial en los tumores mucinosos, por lo que podría ser útil para la diferenciación de estos tipos de tumores.

13.- El perfil antigénico encontrado en el Tumor de Células Claras y en el Tumor de Brenner, AE1/AE3 (+), CAM 5.2 (+), EMA (+), PKK1 (+), S-100 (-) y AFP (-) puede ser un dato útil para apoyar el origen epitelial de los mismos. Sólo con el EMA se encuentra tinción positiva de la sustancia intraluminal de los nidos del Tumor de Brenner.

En las inmunotinciones realizadas con el S-100 se han encontrado tinciones positivas en elementos celulares aislados en el Adenocarcinoma Endometriode y en el Tumor de Células Claras, que podrían interpretarse como elementos nerviosos o neuroendocrinos.

14.- Respecto al endometrio hemos encontrado que el CAM 5.2. y el PKK1 se comportan como marcadores oncofetales, expresándose en el endometrio fetal y en el adenocarcinoma de endometrio, pero no en el endometrio adulto.

Los hallazgos con el EMA muestran un cambio en su patrón de expresión en el endometrio en el desarrollo, el EMA marca de forma homogénea el endometrio fetal, en el endometrio adulto normal se expresa sólo en la mitad basal, tificando de forma homogénea todo el Adenocarcinoma de endometrio.

Dado que en el endometrio morfológicamente normal, adyacente a áreas de Carcinoma de endometrio presenta el mismo patrón con el EMA que las áreas tumorales, se podría concluir que probablemente

con este anticuerpo se puedan evidenciar cambios antigénicos previos a la transformación morfológica tumoral.

15.- En los tejidos estudiados no hemos encontrado ninguna tinción positiva con la alfa-1--antitripsina ni con la AFP, para el Antígeno H solo encontramos expresión en el Adenocarcinoma de endometrio, no en el endometrio fetal.

16.- De nuestro trabajo con los anticuerpos URO podemos concluir que los mismos no son marcadores específicos del urotelio y tejido renal, ya que se han encontrado inmunotinciones en epitelios del tracto genital femenino tanto fetal como adulto. En estos epitelios encontramos una tinción tanto de citoplasma como de membrana, observándose reforzamiento de esta última, más intenso en la zona apical.

17.- De las inmunotinciones realizadas con los anticuerpos URO se puede concluir que hay cambios en la expresión de los mismos a lo largo del desarrollo. Se objetiva la expresión del URO-5 en los túbulos proximales, la del URO-1 en los colectores finales y la del URO-8 en el urotelio en el desarrollo fetal, perdiéndose en el adulto.

18.- El epitelio de la superficie ovárica, en feto y en adulto se tiñe con el URO-1, el URO-5 y el URO-10. No aparece tinción con el URO-8 tanto en el feto como en el adulto. La inmunotinción es más intensa y homogénea en el epitelio fetal, conservándose en los quistes de inclusión observados en el ovario adulto, el patrón de tinción fetal.

19.- En el endometrio, en el endocérvix y en la trompa fetal se expresan los anticuerpos URO-1, el URO-5 y el URO-10, apareciendo el URO-1 de forma más intensa y homogénea en el endometrio y en la trompa fetal.

20.- Del panel de anticuerpos empleados, sólo con el URO-5 se ha observado una diferencia en el patrón de expresión en distintas porciones de la trompa, expresándose el URO-5 de forma más intensa en la porción proximal de la trompa fetal.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

- 1 AGUADO L.I., PETROVIC S.L. AND OJEDA S.R.
Ovarian B- adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*. Vol. 110 N° 4: 1124-1132. 1982.
- 2 AGUIRRE P. SCULLY R.E. WOLFF H. J.
Agyrophil cells in Brenner tumors: Histochemical and immunohistochemical analysis. *J.Gynecol Pathol*. 5: 223-234. 1986.
- 3 AGUIRRE P., THOR A., SCULLY R. E. .
Ovarian small cell carcinoma. Histogenetic considerations based on immunohistochemical and other findings. *Am. J. Clin. Pathol*. 92: 140-149. 1989.
- 4 AIMAN J., FORNERY J.P., AND PARKER R Jr.
Secretion of androgens and estrogens by normal and neoplastic ovaries in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 68: 1-5. 1986.
- 5 ALBERTINI D.F., KRAVIT N.G..
Isolation and biochemical characterization of tennanometer filaments from cultured ovarian granulosa cells. *J. Biol Chem*. 256: 2484-2492. 1981.
- 6 ALLAN F.D.
Essential of human embriology. The genital system. Oxford University Press. 167-184. 1969.
- 7 ALLAN F.D.
Essential of human embriology. The urinary system. Oxford University Press. 157-165. 1969.
- 8 ALLAN F.D.

Essential of human embriology. Genital system. Oxford University Press. 116-129. 1960.

- 9 ALTMANNNSBERGER M., OSBORN M., HOLSCHER A., SCHAUER A.,
WEBER K.
The distribution of keratin type intermediate filaments
in human breast cancer. An immunohistological study.
Virch Arch (Cell Pathol) 37: 277. 1981.
- 10 ALTMANNNSBERGER M., OSBORN M., SCHAUER A., WEBER K.
Antibodies to different intermediate filament proteins.
Cell type-specific markers on paraffin embedded human
tissues. Lab Invest 45: 427-434. 1981.
- 11 ANDERTON B. H.
Intermediate filaments: a family of homologous
structures. J. Muscle Res. Cell Motil. 2: 141. 1981.
- 12 ANDRADE R. E., HAGEN K.A., SWANSON P.E. ET AL.
The use of proteolysis with ficin, for immunostaining
of paraffin sections. Am. J. Clin Pathol. 90:33-39. 1988.
- 13 BARA J., MALAREWICZ A., LOISILLIERS F., BURTIN P.
Antigens common to human ovarian mucinous cyst fluid
and gastric mucosa. Br. J. Cancer. Vol. 36:49-56. 1977.
- 14 BARNES A.C.
Intra-Uterine development. Development of the
genitalia. Lea&Febiger. Philadelphia. 253-272. 1968.
- 15 BASSETT D.L.
The changes in the vascular pattern of the ovary of the
albino rat during the estrous cycle. AM. J. Anat. 43.
Vol. 73: 291.

- 16 BAST R.C., FEENY M., LAZARUS H. AND NADLER L.M.
Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. Clin. Invest. Vol. 68: 1131-1137. 1981.

- 17 BAST R.C. AND KNAPP R.C.
Immunologic approaches to the management of ovarian carcinoma. Semin Oncol 11, 3: 264-274. 1984.

- 18 BATTIFORA H., SHEIBANI K. ET AL.
Antikeratin antibodies in tumor diagnosis : Distinction between seminoma and embryonal carcinoma. Cancer Vol. 54: 843-848. Sep. 1984.

- 19 BENJAMIN E., LAW S.Y., BOBROW L.
Intermediate filaments cytokeratin and vimentin in ovarian sex cordstromal tumours with correlative studies in adult and fetal ovaries. J Pathol Vol. 152: 253-263. 1987.

- 20 BERGE T., BORGLIN N. E.
Brenner tumors. Histogenetic and clinical studies. Cancer. 20: 308-318. 1967.

- 21 BHAN A.K.
Application of monoclonal antibodies to tissue diagnosis. p 1 de Advances in Immunohistochemistry. Masson Publishing USA ,Inc. 1986.

- 22 BHATTACHARYA M., BARLOW J.J.
Tumor-associated antigen for cystadenomas of the ovary. Natl. Cancer Inst Monogr. Vol. 42: 25-32. 1976.

- 23 BHATTACHARYA M., CHATTERJEE S.K., BARLOW J.J. AND FUJI H.

- Monoclonal antibodies recognizing tumor associated antigen of human ovarian mucinous cystadenocarcinomas. *Cancer Res.* Vol 42: 1650-1654. 1982.
- 24 BLAUSTEIN A.
Surface cells and inclusion cysts in fetal ovaries. *Gynecol Oncol.* Vol. 12: 222-233. 1981.
- 25 BLAUSTEIN A., KAGANOWICZ A. AND WELLS J.
Tumors markers in inclusion cysts of the ovary. *Cancer.* Vol. 49: 722-726. 1982.
- 26 BLAUSTEIN A., KANTIUS M., KAGANOWICZ A., PERVEZ N. AND WELLS J.
Inclusions in ovaries of females aged day 1-30 years. *Int.J.Gynecol Pathol.* Vol. 1: 145-153. 1982.
- 27 BLAUSTEIN A., LEE H.
Surface cells of the ovary and pelvic peritoneum: A histochemical and Ultrastucture comparison. *Amer. J Obstet Gynecol.* 120: 234-241. 1974
- 28 BLOOM W. AND FAWCETT D.W.
A text book of histology. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1975.
- 29 BOBROW L.G., MAKIN C.A., LAW S., BODMER W.
Expression of low weight cytokeratin proteins in cervical neoplasia. *J Pathol* 148: 135. 1986.
- 30 BONAZZI DEL POGGETTO D., VIRTANEN I., LEHTO V.P., WALSTROM T. AND SAKSELA E.
Expresion of intermediate filaments in ovarian and uterine tumors. *Int J Gynecol Pathol.* 1983.
- 31 BOSS JH., SCULLY RE., WEGNER KH. AND COHEN RB.

Structural variations in the adult ovary-clinical significance. *Osbtet Gynecol* 25: 747-763. 1965.

- 32 BRADGATE M.G., REDMAN C.W.E., ROLLARSON T.P., WILLIAMS A., BYRNE P. AND KELLY K.
Binding of anti-EMA, AGF 4:48 and the lectin UEA-1t to human ovarian carcinomas: histological and clinical correlations. *BR. J. Obstet. Gynaecol* 96:885-860. 1989.
- 33 BRANSILVER B.R., FERENCZY A. AND RICHART R.M.
Brenner tumors and Walthard cell nests. *Arch Pathol Lab Med* 98: 76-86. 1974.
- 34 BROWN D.C., COLE D., GATTER K.C. AND MASON D.Y.
Carcinoma of the cervix uteri: An assessment of tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki67. *Br J Cancer* 57: 178-181. 1988.
- 35 BROWN L.JR., GRIFFIN N.R. AND WELLS M.
Cytoplasmic reactivity with the monoclonal antibody HMFG1 as a marker of cervical glandular atypia. *J Pathol*, 151: 203-208. 1987.
- 36 BUNDLE D.R., GIDNEY M.A.J., KASSAM N. AND RAHMAN A.F.
Hybridomas specefic for carbohydrates; synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal typing reagents. *J Immunol*. Vol. 129. N° 2 August 678-682. 1982.
- 37 BURDEN H. W., LAWRENCE I.E.
The effects of denervation on the localization of 15 -3 B hidroxy steroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy. *Acta Anat.* 97: 286. 1977.
- 38 BURDEN H.W.

- Ovarian innervation. In: Jones RE (ed). The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution. Plenum Press, New York, 615. 1978.
- 39 BURDEN H.W.
Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. AM J Anat 133-455. 1972.
- 40 Cancer Facts and Figures .American Cancer Society New York. 1983.
- 41 CAPPS M.L., LAWRENCE I.E., BURDEN H.W.
Ultrastructure of the cells of the ovarian interstitial gland in hypophysectomized rats. The effects of stimulation of the ovarian plexus and of denervation. Cell Tissue Res. 193: 433. 1978.
- 42 CASPER S., VAN NAGELL J.R., POWELL D.F. ET AL.
Immunohistochemical localization of tumor markers in epithelial ovarian cancer. Am J Obstet Gynecol 149: 154-158. 1984.
- 43 CELORIO J.A., CALERO F., ARMAS A.
Fundamentos de Oncología Ginecológica. Ed. Díaz de Santos. 1986.
- 44 CERIANI RL., THOMSON K., PETERSONJA., ABRAHAN S.
Surface differentiation antigen of human mammary epithelial cells carried on the human milk fat globule. Proc Nat. Acad Sci USA. 74:582-86. 1977.
- 45 CLEMENT P.B.
Histology of the ovary. Am J. Surg Pathol. 11 (4): 277-303. 1987.
- 46 COOKE P.

A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. J. Cell Biol. 68: 539. 1976.

- 47 COOPER D., SCHERMER A. AND SUN T.T.
Biology of disease. Classification of human epithelia and their neoplasma using monoclonal to keratins: strategies, applications and limitations. Laboratory Investigation 52, 3: 243-256. 1985.
- 48 CORDELL J., RICHARSON T.C. ET AL.
Productionof monoclonal antibodies against human epithelial membrane antigen for use in diagnostic immunohistochemistry. Br J Cancer 52: 347-354. 1985.
- 49 CORDON W.A. AND BLACK D.L.
Catecholamine-induced stimulation of progesterone by the bovine corpus luteum in vitro. Biol Reprod 15: 573. 1976.
- 50 CORDON-CARDO C., FINSTAD C.L., BANDER N.H. AND MELAMED M.R.
Immunoanatomic distribution of cytostructural and tissue-associated antigens in the human urinary tract. AJP, 269-284. Feb. 1987.
- 51 CORDON-CARDO C., MATTES M.J., MELAMED M.R., LEWIS J.L., OLD L.J. AND LLOYD K.O.
Immunopathologic analysis of a panel of mouse monoclonal antibodies reacting with human ovarian carcinomas and other human tumors.. Int. J. Gynecol. Pathol. Vol. 4: 121-130. 1985.
- 52 CORDON-CARDO C., BANDER N.H., FRADET Y., FINSTAD C.L., WHITMORE W.F., LLOYD K. O., OETTGEN H.F. ET AL.

Immunoanatomic dissection of the human urinary tract by monoclonal antibodies. J. Histochem Cytochem. Vol 32. no. 10: 1035-1040. 1984.

- 53 CORDON-CARDO C., LLOYD K.O., FINDSTAD C.L. ET AL.
Immunoanatomic distribution of blood group antigens in the human urinary tract. Influence of secretor status. Lab Invest. 55 (4) 444-454. Oct. 1986.
- 54 CORDON-CARDO C., LLOYD K.O., SAKAMOTO J., MCGROARTY M.E., OLD L.J., MELAMED M. R.
Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma. Int J Cancer 15.37(5): 667-676. May 1986.
- 55 CORDON-CARDO C., REUTER V.E., LLOYD K.O., SHEINFELD J., FAIR W.R., OLD L.J., MELAMED M.R.
Blood group related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursor, LeX and LeY determinants in urothelium carcinoma. Cancer Res 15.48 (14): 4113-4120. Jul. 1988.
- 56 CORSON J.M. AND PINKUS G.S.
Mesotelioma: Profile of Keratin proteins and carcinoembryonic antigen. Am. J. Pathol. Vol. 108. 80-87. 1982.
- 57 CROWTHER M.E., GRUDZINSKAS J.G., POULTON T.A., GORDON JB
Trophoblastic protein in ovarian carcinoma. Obstet Gynecol. 53-59. 1979.
- 58 CROWTHER M.E., BRITTON K.E., GRANOWSKA M AND SHEPHERD J.H.
Monoclonal antibodies and their usefulness in epithelial ovarian cancer. A review. BR. J. Obstet. Gynaecol 96: 516-521. 1989.

- 59 CZERNOBILSKY B., MOLL R., LEVY R., FRANKE W.W.
Coexpresion of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovaii cells of the human ovary. Eur. J. Cell Biol. 37: 175-190. 1985.
- 60 CHANG RJ AND JUDD HL.
The ovary after menopause. Clin Obstet Gynecol 24: 181-191. 1981.
- 61 CHAPMAN CM., ALLOFF EP., PROPPE KH., PROUT GR.
Use of monoclonal antibodies for the localitation of tissue isoantigens A and B in trnsitional cell carcinoma of the upper urinary tract. J. Histochem. Cytochem. Vol. 31: 557-561. 1984.
- 62 CHARPIN C., BHAN A.K., ZURAWSKI V.R. AND SCULLY R.E.
Carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate determinant 19-9 (CA 19-9) localization in 121 primary and metastatic ovarian tumors: an immunohistochemical study with the use of monoclonal antibodies. Int J Gynecol Pathol. 231-245, 1982.
- 63 CHIAPPA S.A., FINK G. AND SHERWOOD N.M.
Immunoreactive luteinizing hormone releasing factor (LRF) in pituitary stalk plasma from female rats: effects of simulating diencephalon,hippocampus and amygdala. J Physiol 267-625. 1977.
- 64 DAABS D.J., GEISINGER K.R., NORRIS H.T.
Intermediate filaments in endometrial and endocervical carcinomas: The diagnostic utility of vimentin patterns. Am. J. Surg. Pathol. 10: 568-576. 1986.

- 65 DABBS D.J. GEISENGER K. R.
Common epithelial ovarian tumors, immunohistchemical intermediate filament profiles. *Cancer* 62:368-374. 1988.
- 66 DARMADY E.M. AND MACLVER A.G.
The development of the normal kidney. *Renal Pathology, Postgraduate Pathology Series*, 1-14.
- 67 DAVIDSOHN I., KOVARIK S.
Isontigens A B and H in bening and malignant lesion of the cervix. *Arch. Pathol Lab Med.* Vol.87:306-314. 1969.
- 68 DAVIDSOHN I., KOVARIK S., LEE CL.
A ,B and O substances in gastrointestinal carcinomas. *Arach. Pathol. Lab. Med.* Vol. 81: 381-390. 1966.
- 69 DAVIDSOHN I., KOVARIK S., STEJSKAL R.
Ovarian cancer: immunologycal aspects, influence on prognosis and treatment. in *UICC Monograph series: Ovarian cancer*, Berlin. Springer Verlag. Vol. 11: 105-121. 1968.
- 70 DELSOL G., STEIN H., PULFORD K.A.F., GATTER K.C.,
ERBER W.N., ZINNE K. AND MASON D.Y.
Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen : Implications for diagnosis of human neoplasma. *Lancet*, 1124-1128. 1984.
- 71 DENK H., TAPPEINER G., DAVIDITIS A., EKERSTOFER R.,
HOLZNER JH.
Carcinoembryonic antigen and blood group substances in carcinomas of the stomach and colon. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol. 53: 933-942. 1974.

- 72 DICTOR M.
Ovarian malignant mixed mesodermal tumour: The occurrence of hyaline droplets containing alpha-1-antitrypsin. Hum. Pathol. 13: 930-931. 1982.
- 73 DWARAKANATH S., LEE AKC., DeLELLIS R.A. ET AL.
S-100 protein positivity in breast carcinomas: a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. Hum. Pathol. 18: 1144-1148. 1987.
- 74 ELLIS I.O., ROBINS R.A. ET AL.
A monoclonal antibody, NCRC11, raised to human breast carcinoma. 1. Production and immunohistological characterization. Histopathology, 8: 501-506. 1984.
- 75 ELLIS I.O., HITCHCOCK A.
An immunohistological study of tumor marker immunoreactivity in Adeno. ca. J. Clin Pathol 41: 1064-67. 1988.
- 76 ENGEL L.L.
The biosynthesis of estrogens. Handbook of Physiology-Endocrinology II. (Part I). Waverly Press. 1973
- 77 EPENETOS A.A., CANTI G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J.,
CURLING M., BODMER W.F.
Use of epithelium-specific monoclonal antibodies for diagnosis of malignancy in serum effusions. Lancet ii: 1004-1006. 1982.
- 78 ERICKSON G.F., MAGOFFIN D.A., DYLER C.A.
AND HOFEDITZ C.
The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. Endocrine Reviews. Vol. 6, N° 3: 371-399. 1985.

- 79 ERICKSON G.F.
Primary cultures of ovarian cells in serum-free medium as models of hormon-dependent differentiation. Mol Cell Endocrinol 29: 21. 1983.
- 80 ESHKOL A., LUHENFELD B.
Gonadotropic regulation of ovarian development in mice during infancy. In: Subcellular distribution of HCG in rat corpus luteum in gonadotropins. John Wiley. N.Y. pág. 335. 1972.
- 81 ESPINOZA C.G., AZAR H.A.
Immunohistochemical localization of keratintype proteins in epithelial neoplasms. Am J Clin Pathol 78: 500. 1982.
- 82 FAJER A.B.
The role of ovarian somatic cells in the onset of meiosis and follicle formation in vitro.
- 83 FAWCETT D.W., LONG J.A., JONES A.L.
The ultrastructure of endocrine glands. Recent Prog Hormone Res 25: 315. 1969.
- 84 FEINBERG R AND COHEN RB.
A comparative histochemical study of the ovarian stromal lipid band, stromal theca cell and normal ovarian follicular apparatus. Am J Obstet Gynecol 92: 958-969. 1965.
- 85 FERGUSON A.M. AND FOX H.
A study of the Ca antigen in epithelial tumours of the ovary. J Clin Pathol. 37: 6-9. 1984.

- 86 FLEMING S. AND GIBSON A.A.M.
Proteinase inhibitors in the kidney and its tumours.
Histopathology 10: 1303-1313. 1986.
- 87 FLEMING S. AND SYMES C.E.
The distribution of cytokeratin antigens in the kidney
and in renal tumors. Histopathology 11:157-170. 1986.
- 88 FRANKE W.W., APPELHANS B., SCHMID E., FREUDENSTEIN
C., OSBORN M. AND WEBER K.
Identification and characterization of epithelial cells
in mammalian tissues by immunofluorescence microscopy
using antibodies to prekeratin. Differentiation 15:
7-25. 1979.
- 89 FRANKE W.W., GRUND C., SCHMID E..
Intermediate-size filaments in Sertoly cells are of
vimentina type. Eur. J. Cell Biol. 19: 269-275. 1979.
- 90 FRANKE W.W., SCHMID E. ET AL.
Differentiation-related patterns of expression of
proteins of intermediate-size filaments in tissues
Biol. 46: 431-453. 1982
- 91 FRANKE W.W., SCHMID E., OSBORN M., WEBER K.
Different intermediate-size filaments distinguished by
immunofluorescence microscopy. Proc Natl. Acad. Sci USA
75: 5034. 1978.
- 92 FRANKE W.W., SCHMID E., WINTER S., OSBORN M., WEBER K.
Widespread occurrence of intermediate-size filaments of
the vimentin-type in cultured cells from diverse
vertebrates. Exp Cell Res. 123: 25. 1979

- 93 FRANKE W.W., WEBER K., OSBORN M., SCHMID E.
Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament like
arrays in various cells of epithelial character. Exp.
Cell Res. 116: 429-445. 1978.
- 94 GABBIANI G., KAPANACI Y., BARZZONE P., FRANKE W.W..
Immunochemical identification of intermediate-size
filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid
for the surgical pathologist. Am. J. Pathol. 104:
206-216. 1981.
- 95 GANJEI P., PENNEYS N.S., AVERETTE H.E., NADJI M.
Brenner tumors of the ovary, an immunohistologic study.
Lab Invest 46: 27A. 1982.
- 96 GATTER K.C., ABDULAZIZ Z., BEVERLEY P.
Use of monoclonal antibodies for the histopathological
diagnosis of human malignancy. J. Clin. Pathol. 35:
1255-1267. 1982.
- 97 GATTER K.C., ALCOCK C., HERYET A. AND PULFORD K.A.F.
The differential diagnosis of routinely processed anas-
plastic tumours using monoclonal antibodies. Am J Clin
Pathol 82: 33-43. 1984.
- 98 GATTER K.C., DUNNILL M.S. ET AL.
New approach to assessing lung tumours in man. J Clin
Pathol 39: 590-593. 1986.
- 99 GATTER K.C., PULFORD K.A.F. ET AL.
An immunohistological study of benign and malignant
skin tumors: epithelial aspects. Histopathology 8:
209-227. 1984.

- 100 GERDES J., LELLE R.J., PECKARTZ H. ET AL.
Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. J Clin Pathol 39: 977-980. 1986.
- 101 GERDES J., LEMKE H., BAISCH H. ET AL.
Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133(4): 1710-1715. 1984.
- 102 GERDES J., SCHWAB U., LEMKE H. AND STEIN H.
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31: 13-20. 1982.
- 103 GHOSH A.K., SPRINGGS A.I., TAYLOR-PAPADIMITIOU J., MASSON D.Y.
Immunocytochemistry staining of cells in pleural and peritoneal effusions with a panel of monoclonal antibodies. J Clin Pathol. 36: 1154-64. 1983.
- 104 GILLMAN J.
The development of the gonads in man, with a consideration of the role of fetal endocrines and the histogenesis of ovarian tumors. Contribution to Embryology. N° 210: 83-132.
- 105 GITLIN D. PERRICELLI A. GITLIN G. M.
Synthesis of alpha -fetoprotein by liver, Yolk sac and gastrointestinal tract of human conceptus. Cancer Res. 32: 979-982. 1972.
- 106 GONZALEZ MERLO J.
Ginecologia. Salvat Editores, S.A. Barcelona. España. 1980.

- 107 GRANOWSKA M., NIMMON C.C. ET AL.
Kinetic analysis and probability mapping applied to the detection of ovarian cancer by radiommunoscintigraphy. J Nucl Med, 29: 594-607. 1988.
- 108 GRAY M.H., ROSENBERG A.E., DICKERSIN G.R., BHAN A.
Glial fibrillary acidic protein and keratin expression by benign and malignant nerve sheath tumors. Hum. Pathol. 20: 1089-1096. 1989.
- 109 GREENE R.R.
Diverse origins of Brenner tumors. Am. J. Obstet. Gynecol. 64: 878-898. 1952.
- 110 GRINSTED J.
The relation between mesonephric kidney function and onset meiosis in the mammalian ovary. Development and function of reproductive organs. Copenhagen, July 6-9: 13-17. 1981.
- 111 GRONE H.J., WEBER K., GRONE E., HELMCHEN U. AND OSBORN M.
Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. AJP 129: 1-8. 1987.
- 112 GRUNWALD P.
The development of the sex cord in the gonads of man and mammals. Am. J. Anat. 70: 359-397. 1942.
- 113 GUPTA RK.
Immunocytologic loss of isoantigens A₀ B and H (O) in endometrium and brain. Am J. Clin. Pathol. Vol. 66: 390-394. 1976.

- 114 GUZMAN J., COSTABEL U., BROSS K.J., WIEHLE U.,
GRUNERT F. AND SCHAEFER H.E.
The value of the immunoperoxidase slide assay in the
diagnosis of malignant pleural effusions in breast
cancer. Acta Cytol 32: 188-192. 1988.
- 115 GUZMAN J., HILGARTH M., BROSS K.J. ET AL.
Malignant ascites of serous papillary ovarian adedearci-
noma. An immunocytochemical study of the tumor cells.
Acta Cytol. 519-522. 1988.
- 116 HAMMERSMITH ONCOLOGY GROUP AND IMPERIAL CANCER RE
SEARCH FUND.
Antigen guided irradiation of malignant lesions: three
cases illusttrtting a new method of treatment. Lancet
.1: 1141-43. 1984
- 117 HARRISON R.G.
Monographs for students of medicine. Clinical embriolo-
gy. The urogenital system. Academic Press. 160-181. 1978.
- 118 HAYDEN H., LANGE P.W., LARSSON S.J..
S100-glia regulation of GABA transport across the nerve
cell membrane. J. Neurol Sci. 45: 303-316. 1980.
- 119 HEALD J., BUKLEY C.H., FOX M.
An immunohistochemical study of the distribution of
carcinoembryonic antigen in epithelial tumors of the
ovary. J. Clin. Pathol. Vol. 32: 918-926. 1979.
- 120 HEIDERNAN E., STRUDLEY I. ET AL.
A new monoclonal antibody to epithelial membrane
antigen (EMA) -E29. A comparison of its immunohistoche-
mical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies
and with another monoclonal antibody.

HMFG-2. Br J Cancer 52: 355-361. 1985.

- 121 HEYDERMAN E., STEELE K., ORMEROD MG.
A new antigen on the epithelial membrane immunoperoxidase localitation in normal and neoplastic tissue. J.Clin Pathol. 32: 35-39. 1979.
- 122 HIDVEGI D., CIBILS LA., SORESEN K. AND HIDVEGI I.
Ultrastructural and histochemical observations of neuroendocrine granules in nonneoplastic ovaries. Am J Obstet Gynecol 143: 590-594. 1982.
- 123 HIGUCHI Y. KOUNO T. TESHIMA H. ET AL.
Serous papillary cystadenocarcinoma associated with alpha-fetoprotein production. Arch Pathol Lab Med 108: 710-712. 1984.
- 124 HITCHCOCK A., ELLIS I.O., BELL J. AND ROBINS A.
An investigation of NCRC11 immunoreactivity in normal and neoplastic epithelia of the female genital tract and ovary. Histopathology, 15: 187-194. 1989.
- 125 HOLTHOFER H., MIETTINEN A. ET AL.
Cellular origin and differentiation of renal carcinomas. A fluorescence microscopic study with kidney-specific antibodies, antiintermediate filament antibodies and lectins. Lab Invest 49: 317-326. 1983.
- 126 HONORE LH. AND O'HARA KE.
Subcapsular adipocytic infiltration of the human a clinipathological study of eight cases. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 10: 13-20. 1980.

- 127 HUANG S.N., MINASSIN H., MORE J.D.
Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab. Invest. 35: 383-390. 1976.
- 128 HUGHESDON PE.
The origin and development of benign stromatosis of the ovary. Br J Obstet Gynecol 79: 348-59. 1972.
- 129 INQUE M., SASAGAWA T. ET AL.
Expression of blood group antigens A,B,H,Lewis-a and Lewis-b in fetal, normal, and malignant tissues of uterine endometrium. Cancer Vol. 60: 2985-2993. 1987.
- 130 INTERNATIONAL FEDERATION OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS.
Classification and staging of malignant tumors in the femal pelvis. Acta Obstet Gynecol Scand. Vol. 50: 1-7. 1971.
- 131 ISAACSON P., JONES D. B., MILLWARD-SADLER G.H. ET AL.
Alpha- 1 antitrypsin in human macrophages. J. Clin. Pathol. 34: 982-990. 1981.
- 132 ISOBE T., OKUYAMA T. .
The amino acid sequence of the alfa subunit in bovine brain S-100a protein. Eur. J. Biochem. 116:79-86. 1981.
- 133 JACOBOWITZ D. AND WALLACH E.E.
Histochemical and chemical studies of the autonomic innervation of the ovary. Endocrinology. Vol 81. 1132-1139. 1967.

- 134 JOACHIM H.L., DORSETT B.H., BARBER HRK.
Immunologic studies of ovarian carcinoma. Vol. 41.635.
1973.
- 135 JORDAN A.W.
Changes in ovarian B-adrenergic receptors during the
estrous cycle of the rat. Biol Reprod, pág.24-25. 1981.
- 136 JORDAN III AA.W., CAFFREY J.L. AND NISWENDER G.D.
Catecholamine-induced stimulation of progesterone and
adenosine 3',5'/monophosphate production by dispersed
ovine luteal cells. Endocrinology 103/385. 1978.
- 137 JUDD H.L., JUDD G.E., LUCAS W.E. AND YEN S.S.C.
Endocrine function of the postmenopausal ovary:
concentration of androgens and estrogens in ovarian and
peripheral vein blood. J Clin Endocrinol Metab 39:
1020-1024. 1974.
- 138 JUDD H.L., LUCAS W.E. AND YEN S.S.C.
Effect of oophorectomy on circulating testosterone and
androstenedione levels in patients with endometrial
carcinoma. Am J Obstet Gynecol 118: 793-8. 1974.
- 139 JUHL BR., HARTZEN SH., HAINAU B.
A B H Antigen expression in transitional cell carcino-
mas of the urinary bladder. Cancer. Vol. 57:1768-1775.
1986.
- 140 KABAWAT S.E., BAST R.C., BHAN A.K., WELCH W.R.,
KNAPP R.C. AND COLVIN R.B.
Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related
antigen recognized by the monoclonal antibody OC125.
Int J Gynecol Pathol, 2, 275-285. 1983.

- 141 KAWAWAT S.E., BAST RC., WELCH W.R.KNAPP R.C. ET AL.
VIN R. D.
Immunopathologic charectizacion of a monoclonal antibody
that recognizes common surface antigens of human
ovarian tumors of serous, endometroid, and clear cell
types. Am J. Clin Pathol. Vol 79:98-104. 1983.
- 142 KAPLAN S.L., AND GRUMBACH M.M.
Gonadotrophins and sex steroids in the fetus. Clin
endocrinol metabol. 489-511. 1978.
- 143 KAWAKAMI M., KUBO K., UEMURA T., NAGASE M.,
AND HAYASHI A.
Involvement of ovarian innervation in steroid secre-
tion. Endocrinolgy. Vol. 109. N° 1: 136-145. 1981.
- 144 KHOO S.K., MACKAY E.V.
Carcinoembryonic antigen (CEA) in ovarian cancer:factor
influencing its incidence and changes which occur in
response to cytotoxic drugs. Br. J. Obstet Gynaecol.
Vol. 33: 753. 1976.
- 145 KINDLOM L.G., LODDING P., ROSENGREN L. ET AL.
S-100 protein in melanocytic tumors. Acta.Path.Micro-
biol. Scand Sect. A. 92: 219-230. 1984.
- 146 KNAPP L.W., O'GUIN W.M., SAWYER R.H.
Drugs induced alteration of cytokeratin organitati on
in cultured epithelial cells. Science 219: 501. 1983.
- 147 KÖHLER G., MILSTEIN C.
Continuous cultures of fussed cells secreting antibody
of predefined specifity. Nature. Vol.256:495-497. 1975.

- 148 KOVARIK S., DAVIDSOHN I., STEJSKAL R.
ABO antigens in cancer: Detection with the mixed cell agglutination reaction. Arch. Pathol. 86:12-21 July 1968.
- 149 KURMAN R.J. AND NORRIS H.J.
Endodermal sinus tumor of the ovary. Cancer 38: 2404-2419. 1976.
- 150 KURMAN R.J. AND NORRIS H.J.
Embryonal carcinoma of the ovary. Cancer 38: 2420-2433. 1976.
- 151 KURMAN R.J., SCARDINO P.T.
Alph-fetoprotein and human corionic gonadotropin in ovarian and testicular germ cells tumors. Diagnostic Immunohistocytochemistry. Masson Publishing USA, Inc. New York. pag. 127. 1981.
- 152 KURMAN R.J., SCARDINO P.T., MCINTIRE K.R., WALDMANN T.A. AND JAVAPOUR N.
Cellular localization of alpha-fetoprotein and human chorionic godadotropin in germ cell tumors of the testis using an indirect immunoperoxidase technique. Cancer 40: 2136-2151. 1977.
- 153 LANGMAN J., WILSON D.B.
Embryology and congenital malformations of the female genital tract. In Pathology of the Female Genital Tract. Edited by Blaustein A. ed. 2. Chap 1. P. 6. New York, Springer Verlag. 1982.
- 154 LAZARIDES E., HUBBARD B. D. .
Immunological characterization of the subunit of 100-AA filaments from muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA. 73: 4344. 1976.

- 155 LEVI M.M., PARSHLEY M.S., MAND I.
Antigenicity of papillary serous cystadenocarcinoma tissue culture cells. Am. J. Obstet Gynecol. Vol. 102: 433. 1968.
- 156 LIEM R.K.H., YEN S.H., SALOMON G.D., SHELANSKI M.L.
Intermediate filaments in nervous tissues. J. Cell Biol. 79: 637. 1978.
- 157 LIFSCHITZ-MERCER B., CZERNOBILSKY B. ET AL.
Selective expression of cytokeratin polypeptides in various epithelia of human brenner tumor. Human Pathol, Vol. 19: 640-650. 1988.
- 158 LONING T., STAQUET M.J., THIVOLET J., SEIFERT G.
Keratin polypeptides distribution in normal and diseased human epidermis and oral mucosa. Immunohistochemical study on unaltered epithelium and inflammatory, premalignant and malignant lesions. Virch Arch (Pathol Anat) 388: 273. 1980.
- 159 LLOYD K.O.
Human ovarian cancer and antigens. London. Academic Press. 205-211. 1982.
- 160 MAGOFFIN D.A., REYNOLDS D.S. AND ERICKSON G.F.
Direct inhibitory effect GnRH on secretion by ovarian interstitial cells. Endocrinology. Vol. 109. N° 2: 661-663. 1981.
- 161 MAGOFFIN D.A., ERICKLSON G.F.
Primary culture of differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium. J. Biol Chem. 257: 4507. 1982.

- 162 MAHRLE G., BOLLING R., OSBORN M., WEBER K.
Intermediate filaments of the vimentin and prekeratintype in human epidermis. J. Invest Dermatol. 81: 46-48. 1983.
- 163 MAKIN C.A., BOBROW L.G. AND BODMER W.F.
Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. J. Clin Pathol. 37:975-983. 1984.
- 164 MANI R.S., BOYES B.E., KAY C.M.
Physiochemical and optical studies on calcium and potassium induced conformational changes in bovine brain S-100b protein. Biochemistry. 21: 2607-2612. 1982.
- 165 McCARTY K.S. Jr., LUBAHT D.B. AND McCARTY K.S. Sr.
Oestrogen and progesterone receptors: physiological and pathological considerations. Clinics in Endocrinology and Metabolism. Vol. 2, N° 1: 133-154. 1983.
- 166 McGURRIN J.F., DORIA M.I. ET AL.
Assessment of tumour cell kinetics by immunohistochemistry in carcinoma of breast. Cancer 59:1744-1750. 1987.
- 167 MIETTINEN M., LEHTO V.P. AND VIRTANEN I.
Antibodies to intermediate filament proteins in the diagnosis and classification of human tumors. Ultrastru Patho 7: 83-107. 1984.
- 168 MIETTINEN M., LETHO V.P., VIRTANEN I.
Expression of intermediate filaments in normal ovarian epithelial, sex cord-stromal and germinal tumors. Int. J. Gynecol Pathol. 2: 64-71. 1983.
- 169 MIETTINEN M., WAHLSTROM T., VIRTANEN I.,
TALERMAN A., ASTENGO-OSUNA C.

Cellular differentiation in ovarian sex cordstromal and germ cell tumours studied with antibodies to intermediate filament proteins. *Am J Surg Pathol* 145: 127-190. 1985.

- 170 MITCHELL D., IBRAHIM S., GUSTERSON B.A.
Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *J Histochem Cytochem* 33: 491. 1985.
- 171 MOLIN S.O., ROSENGREN L., BAUDIER J. ET AL.
S-100 alpha like immunoreactivity in tubules of rat kidney. *J. Histchem. Cytochem.* 33: 367-374. 1985.
- 172 MOLL R., FRANKE W.W., SCHILLER L., GEIGER B. AND KREPLER R.
The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell Vol.* 31: 11-24. 1982.
- 173 MOLL R., LEVY R. ET AL
Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasm of genital tract. *Lab. Invest.* 49: 599-610. 1983.
- 174 MOORADIAN A.D., MORLEY J.E. AND KOREMAN S.G.
Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* Vol. 8-1, 1-4. 1987.
- 175 MOORE B.W.
A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19: 739-744. 1965.
- 176 MORI M., AMBE K., ADACHI Y. ET AL.

Prognostic value of immunohistochemically identified CEA,SC,AFP, and S-100 protein-positive cells in gastric carcinoma. Cancer 62: 534-540. 1988.

- 177 MOTZER R.J., REUTER V.E., CORDON-CARDO C.,BOLS G.J.
Blood group-related antigens in human germ cell tumor.
Cancer Res. 15.48(18): 5342-5347. Sep. 1988.
- 178 MULLER U.
Morphogenetic factors godanal differentiation. Develop-
ment and function of reproductive organs. Copenhagen,
July 6-9: 256-260. 1981.
- 179 NADLER L.M., RITZ J., HARDY R., PESANDO J.M. AND
SCHLOSSMAN S.F.
A unique cell surface antigen identifying lymphoid
malignancies of B cell origin. J Clin.Invest. In press.
- 180 NAGLE R.B., CLARK V.A., McDANIEL K.M., DAVIS J.R.
Immunohistochemical demonstration of keratins in human
ovarian neoplasms. A comparison of methods. J Histochem
Cytochem 31: 1010-1014. 1983.
- 181 NEILSON D., JONES G.S. ET AL.
The innervation of the ovary. Obstet Gynecol Suv. 25:
889. 1970.
- 182 NIEHANS G.A., MANIVEL J.C. ET AL.
Immunohistochesmistry of germ cell and trophoblastic
neoplasms. Cancer Vol. 62: 1113-1123. Sep. 1988.
- 183 NOGALES F. SILVERBERG S.G. BLOUSTEIN P.A ET AL
Yolk sac carcinoma (endodermal sinus tumor). Ultrastuc-
ture and histogenesis of gonadal and extragonadal

tumors in comparison with normal human yolk sac. Cancer 39: 1462. 1977.

- 184 ORMEROD M.G., STEELE K., WESTWOOD J.H. AND MAZZINI M.N.
Epithelial membrane antigen: Partial purification assay and properties. Br J Cancer 48: 533-541. 1983.
- 185 ORNTOFT T.F., WOLF H., CLAUSEN H., HAKAMORI S.,
DABELSTEEN E.
Blood group ABO and Lewis antigens in fetal and normal adult bladder urothelium: immunohistochemical study of type 1 chain structures. J Urol 138 (1): 171-176. Jul. 1987.
- 186 OSBORN M., CASELITZ J., WEBER K. .
Heterogeneity of intermediate filament expression in vascular smooth muscle: A gradient in desmin positive cells from the rat aortic arch to the level of the arteria iliaca communis. Differentiation. 20: 196-202. 1981.
- 187 OSBORN M., WEBER K..
Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. Lab. Invest. 48: 372-394. 1983.
- 188 PALACIN FORGUE A.
Técnicas inmunohistoquímicas: Aspectos teórico prácticos. Editor: ATOM .Barcelona, pág: 1-44. 1984.
- 189 PAYNE A.H. AND JAFFE R.B.
Androgen formation from pregnenolone sulfate by the human fetal ovary. J. Clin Endocrinol Metab. Vol. 39, N° 2: 300-304. 1974.

- 190 PINKUS G.S., KURTIN P.
Epithelial membrane antigen- a diagnostic discriminant in surgical pathology: immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. Hum Pathol 16: 929-940. 1985.
- 191 PRICE M.R., EDWARDS S., POWELL M. AND BALDWIN R.W.
Epitope analysis of monoclonal antibody NCRC11 defined antigen isolated from human ovarian and breast carcinomas. Br J Cancer, 54: 393-400. 1986.
- 192 PUTTS J., MOESKER O., HUYSMANS A. ET AL
Monoclonal antibodies to cytokeratins in study of pre-malignant lesions of uterine cervix. J. Pathol. 143: A6. 1984
- 193 RAJU G. C.
Expression of the cytokeratin marker CAM 5.2. in cervical neoplasia. Histopathology. 12: 437-443. 1988.
- 194 RAMAEKERS F., PUTS J., KANT A., MOESKER O.
JAP P., VOOIJS P.
Differential diagnosis of human carcinomas, sarcomas and their metastases using antibodies to intermediate-sized filaments. Eur J Cancer Vol. 18 N° 12: 1251-1257. 1982.
- 195 RAMAEKERS F., PUTS J., MOESKER O., KANT A., JAP P.,
AND VOOIJS P.
Demonstration of keratin in human adenocarcinomas. Am J Pathol, 111: 213-223. 1983.
- 196 RAMAEKERS F.C.S., PUTS J.J.G., MOESKER O., KANT A.,
AND VOOIJS G.P.
Intermediate filaments in malignant melanomas.

Identification and use as marker in surgical pathology.
J. Clin. Invest. Vol. 73: 635-643. March 1983.

- 197 RAWLINGS W., MOSS J., COOPER H.S. AND
HAMILTON S.R.
Hematocellular carcinoma and partial deficiency of
alpha1 antitrypsin (MZ). Anal Int Med.81:771-773. 1974.
- 198 RAYMOND W.A., LEONG A.S.
Vimentin- a new prognostic parameter in breast carcino-
ma?. J Pathol. 158: 107-114. 1989.
- 199 REDDING W.H., COOMBES R.C., MONAGHAN P. ET AL.
Detection of micrometastasis of patients with primary
breast cancer. Lancet. ii. 1271-73. 1983.
- 200 REEVES G.
Specific stroma in the cortex and medulla of the ovary.
Cell types and vascular supply in relation to
follicular apparatus and ovulation. Obstet Gynecol.
Vol. 37: 832-844. 1971.
- 201 REINHERZ E.L., NADLER L.M., SALLAN S.E. AND
SCHLOSSMAN S.F.
Subset derivation of T cell all in man. J.Clin. Invest.
64: 392-397. 1979.
- 202 RICE BF. AND SAVARD K.
Steroid hormone formation in the human ovary: IV tive
steroid from acetate 1-14 C and action of gonadotro-
pins. J Clin Endocrinol 26: 593-609. 1966.
- 203 SANTINI D., GELLI M.C., MAZZOLENI G. ET AL.
Brenner Tumor of the ovary: A correlative histologyc,
histochemical, immunohistochemical, and ultra

- structural investigation. Hum. Pathol. 20: 787-795. 1989.
- 204 SCHMITT F.C., BACCHI C.E.
S-100 protein: is it useful as a tumor marker in diagnostic immunocytochemistry?. Histopathology. 15: 281-288. 1989.
- 205 SCHOENGTAG R., WILLIAMS B., KUHN W.
The distribution of blood group substance H and CEA in colorectal cancer. Cancer. Vol. 53: 503-509. 1984.
- 206 SCHWARTING R., GERDES J., NIEHUS J., JAESCHKE L., AND STEIN H.
Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody K167. J Immunol Methods 90: 65-70. 1980.
- 207 SCULLY RE.
Tumors of the ovary and maldeveloped gonads. (Atlas of Tumor Pathology: 2nd ser. fasc161 Washintong DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1979.
- 208 SCULLY R.E.
Ovarian tumors, a review. Am. J. Pathol. Vol. 87: 686-720. 1977.
- 209 SCULLY R.E., BARLOW J.F.
Mesonephroma of ovary: tumor of müllerian nature related to the endometrioid cacinoma. Cancer 20: 1405-1417. 1967.
- 210 SEAL G.M., ROWLAND R.G., THOLLA J.V. ET AL.
A ,B and H antigens in normal urothelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies with

- avidin biotin complex technique. J Urol 133:513-516. 1985.
- 211 SEEGAR JONES G.E., GOLDBERG B. AND WOODRUFF J.D.
Histochemistry as a guide for interpretation of cell function. Am J.Obstet Gynecol. 100: 76-83. 1968.
- 212 SELDENRIJK C.A., WILLING A.P., BAAK J.P.A. ET AL.
Malignant Brenner tumor. A histologic, morphometrical, immunohistochemical and ultrastructural study. Cancer. 58: 754-760. 1986.
- 213 SEMENOVA I.I.
Adrenergic innervation of ovaries in Stein-Leventhal syndrome. Vestn Akad Med Nauk SSSR 24: 58. 1969.
- 214 SEROW S.F., SCULLY R.E., SOBIN L.H.
International histological classification of tumors no. 9. Histological typing of ovarian tumors. Geneva, World Health Organization. 1973.
- 215 SHEIBANI K., BATTIFORA H., BURKE J.S., RAPPAPORT H.
Lue-M antigen in human neoplasms: An immunohistologic study of 400 cases. Am J Surg Pathol 10: 227-236. 1986.
- 216 SHEPHERD J.H., GRANOWSKA M., BRITTON K.E., MATHER S.,
EPENETOS A.A., WARD B.G. AND SLEVIN M.
Tumor-associated monoclonal antibodies for the diagnosis and assesment of ovarian cancer. BR. J. Obstet. Gynaecol 94: 160-167. 1987.
- 217 SILVERBERG S.G., WILSON M. .
Ultrastructure of the Brenner tumor. Am. J. Obstet. Gynecol. 112: 91-100. 1972.

- 218 SLOANE J.P., ORMEROD M.G.
Distributium of epithelial membrane antigen, in normal and and neoplstic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer* 47: 1786-95. 1981
- 219 SOLERE M., HAEGEL P.
Embriologia, cuadernos prácticos. Toray-Masson. Barcelona. 1970.
- 220 STAMENKOVIC I., SKALLI O. AND GABBIANI G.
Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli. *AJP* 123: 465-475. 1986.
- 221 STAMP G.W. AND KRAUSZ T.
Fine needle aspiration cytology of a recurrent juvenile granulosa cell tumor. *Acta Cytologica* 533-539. 1988.
- 222 STEINERT P.M., JONES J.C.R., GOLDMAN R.D.
Intermediate filaments *J. Cell Biol.* 99: 22. 1984.
- 223 STEINERT P.M. STEVEN A.C.
The molecular biology of intermediate filaments. *Cell*. Vol. 42: 411-419. Sept. 1985.
- 224 STERNBERG WH
The morphology androgenic function, hyperplasia and tumors of the human ovarian hilus cells. *Am J Pathol* 25: 493-521. 1949.
- 225 STERNBERG WH. AND ROTH LM.
Ovarial stromal tumors containing Leyding cells. Stromal-Leydig cell tumor and nonneoplastic transformation of ovarian stroma to Leydig cells. *Cancer* 32: 940-951. 1973.

- 226 STERNBERG W.H.
The morphology, androgenic fraction, hyperplasia, and tumors of the human ovarian cells. Am J Pathol 25: 493. 1949.
- 227 STERNBERG W.H., SEGALOFF A. AND GASKILL C.J.
Influence of chorionic gonadotropin on human ovarian hilus cells (Leydig-like cells) J Clin Endocrinol Metab 13: 139-153. 1953.
- 228 STERNBERGER L.A.
Immunocytochemistry, 2nd ed., John Wiley, NY. 1979.
- 229 SVENSSON K.G., OWMAN CH., SJOBERG N.O., SPORRONG B. AND
AND WALLEB B.
Ultrastructural evidence for adrenergic innervation of the interstitial gland of Guinea pig ovary. Neuroendocrinology 17: 40-47. 1975.
- 230 SZULMAN A.E.
The histological distribution of blood group substances A and B in man. J. Exp. Med. Vol. 111: 785-799. 1960.
- 231 TAKAHASHI K., ISOBE T. ET AL.
Immunohistochemical study on the distribution of alpha and beta subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. Vich Arch. 45: 385-396. 1984.
- 232 TALAMO R.C.
Pediatrics for the clinician. Basic and clinical aspects of the alpha1-antitrypsin. Pediatrics Vol. 56 No.1, Pág. 91-99. July 1975.
- 233 TAYLOR C.R.

Immunoperoxidase techniques. Practical and theoretical aspects. Arch Pathol Lab Med 102: 113-121. 1978.

- 234 TEGLBJORG CS., NORRILD B., DABELSTEEN E.
Changes of blood group antigens in premalignant and malignant lesions of the human exocervix. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Vol. 93: 149-151. 1985.
- 235 TELIUM G.
Classification of endodermal sinus tumors (mesoblastoma vitellinum) and so-called "embryonal carcinoma" of the ovary. Acta Pathol. Microbiol Scand. 64: 407-429. 1965.
- 236 TOMASZEWSKI J.E. AND KORNSTEIN M.J.
Sensitivity and specificity of URO antibodies in diagnostic surgical pathology. Lab. Invest 52: 68A. 1985. (Abstract).
- 237 TSENG S.C.G., JARVINEN M.J., NELSON W.G. ET AL.
Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. Cell. 30: 361-362. 1982.
- 238 TURNBULL J.E., BAILDAM A.D., BARNES D.M. AND HOWELL A.
Molecular expression of epitopes recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2 in human breast cancer: diversity variability and relationship to prognostic factors. Int J Cancer 38: 89-96. 1986.
- 239 ULBRIGHT T.M., ROTH L.M., STEHMAN F.B., TALEMAN A., SENEKJIAN E.K.
Poorly differentiated (small cell) carcinoma of the ovary in young women: evidence supporting a germ cell origin. Hum Pathol 18: 175-184. 1987.

- 240 UNSICKER K.
Qualitative and quantitative studies on the innervation of the corpus luteum of rat and pig. *Cell Tissue Res* 152-513. 1974.
- 241 UPADHYAY S., LUCIANI JM. AND ZAMBONI L.
The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. *Development and function of reproductive organs*. Copenhagen, July 6-9: 18-29. 1981.
- 242 VAN EIKEN P., SCIOT R. AND DESMET V.J.
A cytokeratin immunohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can express "bile duct-type" cytokeratins. *Histopathology*, 15: 125-135. 1989.
- 243 VAN MUIJEN G.N.P., RUTTER D.J ET AL.
Monoclonal antibodies with different specificities against cytokeratins. *AJP*, 9-17. 1984.
- 244 VEDTOFTE P.
Distribution of type 1 and 2 blood group chains in normal and pathological odontogenic epithelium defined by monoclonal antibodies specific for Lea and H type 2. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. (A)* 93(5): 265-276. Sep. 1985.
- 245 VELDHUIS J.D., HARRISON T.S. AND HAMMOND J.M.
B-2 adrenergic stimulation decarboxylase activity in porcine granulosa cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 627: 123. 1980.
- 246 VERMEULEN A.

The hormonal activity of the postmenopausal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 247-253. 1976.

- 247 VIALE G., GAMBACORTA M., DELL'ORTO P., COGGI G.
Expression of cytokeratins and vimentin on epithelial tumours of the ovary: immunocytochemical study of eighty-three cases. *Virch Arch A*. 413: 91-101. 1988.
- 248 VIRTANEN I., MIETTINEN M., LEHTO V.P., KARINIEMI A.
AND PAASIVUO R.
Diagnostic application of monoclonal antibodies to intermediate filaments. *Ann acad sci New York* 455: 635-648.
- 249 WARTENBERG H.
The influence of the mesonephric blasfema on gonadal development and sexual differentiation. *Development and Function of Reproductive Organs*. Copenhagen, July 6-9: 3-11. 1981.
- 250 WELLS C.A., HERYET A., GATTER K.C., MASSON D.Y.
The immunocytochemical detection of axillary micrometastasis in breast cancer. *Br. J. Cancer*. 50: 193-97. 1984.
- 251 WILEY E.L., MENDELSON G., EGGLESTON JC.
Distribution of carciniembryonic antigens and blood group substances in adenocarcinoma of the colon. *Lab Invest*. Vol. 44: 507-513. 1981.
- 252 WOLF U.
The H-Y antigen: interaction of several genes in gonadal differentiation. *Development and function of reproductive organs*. Copenhagen, July 6-9. 261.263. 1981.

- 253 WOLFF K., STINGLE G.
The Langerhans' cell (suppl). J. Invest. Dermatol. 80:
17-21. 1983.
- 254 WONG F.W.S. AND TATTERSALL M.H.N.
Immunohistochemical determination of tumor growth
fraction in human ovarian carcinoma. BR. J. Obstet.
Gynaecol 96: 720-724. 1989.
- 255 WOTHERSPOON A.C. NORTON A.J. ISAACSON P.G.
Immunoreactive cytokeratins in plasmocitomas. Histopa-
thology. 14: 141-150. 1989.
- 256 YEN S.H., FIELDS K.L.
Antibodies to neurofilament, glial filament and fibro-
blast intermediate filament proteins bind to different
cell types of the nervous system. J. Cell Biol. 88:
115-126. 1981.
- 257 YUAN M., ITZKOWITZ S H., PELEKAR A. ET AL.
Distribution of blood group antigens A, B, H, Lewis a
and Lewis b in human normal, fetal and malignant colonic
tissue. Cancer Res. Vol. 45: 4499-4511. 1985.
- 258 ZAMBONI L., UPADHYAY S., BEZARD J. AND MAULEON P.
The role of the mesonephros in the development of the
mouse testis and its excurrent pathways. Development
and function of reproductive organs. Copenhagen, July
6-9: 31-40. 1981.
- 259 ZHANG J., YOUNG RH., ARSENEAU J. AND SCULLY RE.
Ovarian stromal tumors containing lutein or Leydig
cells (luteinized thecomas and stromal Leydig cell
tumors)- a clinicopathological analysis of fifty cases.
Int J Gynecol Pathol 1: 270-285. 1982.

- 260 ZIRKER T.A., SILVA E.G., MORRIS M., ORDOÑEZ N.G.
Immunohistochemical differentiation of clear-cell carcinoma of the female genital tract and endodermal sinus tumor with the use of alpha-feto-protein and Leu-M1. Am J Clin Pathol 91: 511-514. 1989.